

Université de Montréal

Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur corticotrope Tpit par la CRH :
implication des voies de signalisation et des coactivateurs.

Par

Catherine Couture

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Novembre 2006

© Catherine Couture, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur corticotrope Tpit par la CRH :
implication des voies de signalisation et des coactivateurs.

Présenté par :

Catherine Couture

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....Jean-Philippe Gratton.....
président-rapporteur

.....Jacques Drouin.....
directeur de recherche

.....André Tremblay.....
membre du jury

RÉSUMÉ

L'axe corticotrope joue un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie chez l'adulte, tout particulièrement lors de la réponse au stress. Un régulateur important dans ce système est l'hormone hypothalamique CRH qui contrôle la production de la pro-opiomélanocortine (POMC) par l'hypophyse. Mon laboratoire a déjà montré que les membres de la famille de récepteurs nucléaires orphelins Nur peuvent médier une réponse transcriptionnelle induite par CRH. L'activation des voies cAMP/PKA et MAPK par la CRH résulte en une augmentation de la capacité des dimères de facteurs Nur à lier l'ADN et à recruter des coactivateurs transcriptionnels afin d'activer la transcription du gène POMC. Je rapporte qu'un autre facteur de transcription du gène POMC peut médier la réponse au CRH.

Tpit est un facteur de transcription à boîte T exprimé seulement dans les cellules POMC de l'hypophyse. Il a initialement été décrit comme un régulateur histo-spécifique de la transcription du gène POMC et par la suite, comme un facteur essentiel à la différenciation des lignées corticotrophes et mélanotrophes. J'ai montré que l'élément de réponse à Tpit du promoteur de POMC répond aux signaux CRH qui augmentent l'activité transcriptionnelle de Tpit. De plus, j'ai démontré que les coactivateurs SRC/p160 sont recrutés par Tpit. La synergie observée entre la signalisation et les coactivateurs est vraisemblablement le résultat de modifications post-traductionnelles apportées par la cascade de kinases, favorisant ainsi l'interaction entre Tpit et les SRC. Avec ces travaux, je décris donc une nouvelle fonction de Tpit chez l'adulte et définis un des premiers mécanismes de régulation d'un facteur à boîte T qui implique les coactivateurs SRC et la signalisation CRH/PKA/MAPK.

Mots-clé : Tpit, CRH, PKA, coactivateurs SRC/p160

ABSTRACT

The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis plays a primordial role in the control of homeostasis. An important regulator in this system is hypothalamic CRH that largely controls POMC production by the pituitary gland. My laboratory already showed that members of the Nur family of orphan nuclear receptors can mediate a transcriptional response to CRH. The activation of cAMP/PKA and MAP kinase pathways enhances the DNA binding ability of Nur factor dimers and their ability to recruit transcriptional coactivators leading to increased POMC transcription. I now report that another POMC transcription factor can mediate CRH responsiveness.

Tpit is a T-box transcription factor that is only expressed in pituitary cells. It was first described as a cell-specific regulator of POMC transcription and then as an essential factor for differentiation of pituitary POMC lineages. I showed that the Tpit response element of the POMC promoter is responsive to signal elicited by CRH and that these signals increase the transcriptional activity of Tpit. This effect is achieved through similar signalling pathways as those used in Nur-mediated CRH response. Moreover, I demonstrated that SRC/p160 coactivators are recruited to Tpit. The synergy between signal transduction and coactivators is probably the result of post-translational modifications elicited by protein kinases that enhance interaction between Tpit and SRC. I have thus described a new function for Tpit and provided the first description of transcriptional regulation of a T-box factor by SRC coactivators and CRH/PKA/MAPK signalling pathways.

Key words: Tpit, CRH, PKA, SRC/p160 coactivators

TABLE DES MATIÈRES

Titre.....	I
Identification du jury	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières	V
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations.....	XI
Remerciements.....	XIX

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 L'axe neuroendocrinien corticotrope	2
1.1.1 L'hypophyse et l'ACTH au centre de l'axe	5
1.1.2 L'hypothalamus et la CRH au sommet de l'axe	9
1.1.3 Les glandes surrénales et les glucocorticoïdes au bas de l'axe	10
1.1.4 Modèles murins d'axe corticotrope non-fonctionnel	11
1.1.4.1 La souris CRH ^{-/-}	12
1.1.4.2 La souris CRHR ^{-/-}	13
1.1.4.3 La souris POMC ^{-/-}	13
1.1.4.4 La souris GR ^{-/-}	14
1.2 La pro-opiomélanocortine.....	14
1.2.1 La structure du gène POMC hypophysaire	15
1.2.2 La maturation de la POMC	16

1.2.3 Les peptides POMC	17
1.2.4 Sites d'expression des peptides POMC et leurs principales fonctions	19
1.3 Régulation de la transcription du gène POMC	21
1.3.1 Étude du promoteur	22
1.3.2 Régulation histo-spécifique du gène POMC par les facteurs de transcription ..	27
1.3.2.1 Le facteur bHLH NeuroD1	28
1.3.2.2 Le facteur à homéodomaine Pitx1	30
1.3.2.3 Le facteur à boîte T Tpit	32
1.3.3 Régulation du gène POMC par les signaux extracellulaires.....	36
1.3.3.1 La cytokine LIF, les facteurs STAT et le gène POMC	38
1.3.3.2 Le facteur de croissance BMP4, le facteur Smad et le gène POMC	39
1.3.3.3 L'hormone stéroïdienne glucocorticoïdes, GR et le gène POMC	40
1.3.3.4 L'hormone peptidique CRH et le gène POMC	41
1.3.3.4.1 Les coactivateurs de la famille SRC/p160	45
1.4 Objectifs de travail	47

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Plasmides	50
2.2 Culture cellulaire et transfections	50
2.3 Préparation des extraits cellulaires	52
2.3.1 Extraits nucléaires	52
2.3.2 Extraits totaux pour retard sur gel	53
2.3.3 Extraits totaux pour isofocalisation en deux dimensions (Gel 2D)	53

2.4 Retard sur gel (Gel shift)	53
2.5 Immunobuvardage (Western blot)	54
2.6 Essai d'interaction protéique <i>in vitro</i> (Pulldown assay)	55
2.7 Isofocalisation bi-dimensionnelle (Gel 2D)	56
2.8 Essai kinase <i>in vitro</i>	56

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1 Tpit est un médiateur de l'action de la CRH sur le promoteur du gène POMC	59
3.2 Action des coactivateurs transcriptionnels	61
3.3 Synergie entre les signaux d'activation et le recrutement de coactivateurs sur Tpit..	63
3.4 Domaine(s) protéique(s) d'importance pour le rehaussement de l'activité transcriptionnelle de Tpit par PKA + SRC-2	65
3.5 La phosphorylation des coactivateurs est essentielle à leur synergie avec la voie PKA pour l'activation de Tpit	68
3.6 Tpit est une cible directe des voies de signalisation	71
3.7 Séquences cibles pour la phosphorylation dans la protéine Tpit	75

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Mécanisme(s) responsable(s) de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Tpit	80
4.2 Recrutement de coactivateurs par Tpit	83
4.3 Modifications post-traductionnelles du facteur à boîte T Tpit	84

4.4 Modifications post-traductionnelles des coactivateurs SRC/p160	87
4.5 Formation d'un complexe coactivateur au promoteur du gène POMC	88
4.6 Rôle de renfort du partenaire transcriptionnel Pitx1	90
4.7 Tpit et ses coactivateurs dans la différenciation terminale des cellules corticotropes	92
4.8 Pertinence <i>in vivo</i> du rôle de Tpit dans la réponse à la CRH	94
4.9 Conclusions	95

BIBLIOGRAPHIE.....	97
--------------------	----

ANNEXES.....	XX
--------------	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Figure 1.1 Axe neuroendocrinien hypothalamo-hypophyso-corticossurénalien	4
Figure 1.2 Clivage de la POMC dans l'hypophyse	18
Figure 1.3 Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur du gène POMC.....	26
Figure 1.4 Signalisation et facteurs impliqués dans la régulation extrinsèque du promoteur du gène POMC	37

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

Figure 3.1 Tpit est un médiateur de l'action de la CRH sur le promoteur du gène POMC	60
Figure 3.2 Action des coactivateurs transcriptionnels	62
Figure 3.3 Synergie entre les signaux d'activation et le recrutement de coactivateurs sur Tpit	64
Figure 3.4 Identification des domaine(s) protéique(s) d'importance dans les protéines Tpit et SRC-2	67
Figure 3.5 La phosphorylation des coactivateurs SRC est essentielle à leur synergie avec la voie PKA sur l'activité de Tpit	70
Figure 3.6 Tpit est la cible des voies de signalisation : la voie induite par la CRH mène à des modifications post-traductionnelles sur la protéine Tpit	74
Figure 3.7 Séquences cibles de Tpit pour la phosphorylation	77

ANNEXES

Annexe 1 L'élément CE-3 (Tpit/Pitx1-RE) du promoteur POMC est un médiateur de la réponse à l'hormone hypothalamique CRH	XXI
Annexe 2 Les voies AMPc/PKA et MAPK sont toutes deux nécessaires à l'activation de l'élément CE-3 par la CRH	XXII
Annexe 3 La capacité d'interaction entre Tpit et Pitx1 n'est pas augmentée par la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA	XXIII

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
A (Ala)	Alanine
ACTH	Adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	« Activation function »
Alk	« Activin-like kinase »
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP1/2	« Activator protein 1/2 »
AR	Récepteur aux androgènes
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Vasopressine
β -gal	β -galactosidase
bHLH	Domaine région basique-hélice-boucle-hélice
BMP	« Bone morphogenic protein »
bp	Paire de base
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Cytosine
C-	Carboxy

CAMKII	« Calmodulin-dependent protein kinase II »
CARM-1	« Co-activator-associated arginine methyltransferase-1 »
CASK	« Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase »
CBP	« cAMP-response element binding protein- binding protein »
CE	Élément central
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CLIP	« Corticotropin-like intermediate lobe protein »
CoA	Coenzyme A
COUP-TF	« Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor »
CREB	« cAMP-response element binding protein »
CRH	« Corticotropin releasing hormone »
CRHR	Récepteur à la CRH
CUTE	« Corticotroph upstream transcription element-binding »
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DE	Élément distal
DMEM	« Dulbecco's modified eagle medium »
DTT	Dithiothréitol
e	Jour embryonnaire
end	Endorphine
ER	Récepteur aux oestrogènes
ERK (p44/p42)	« Extracellular signal-regulated kinase »

FBS	Sérum de bovin fœtal
FSH	Follitropine ou « follicle-stimulating hormone »
G	Guanine
Gc	Glucocorticoïdes
GH	Hormone de croissance ou « growth hormone »
GHRH	« Growth hormone releasing hormone »
GnRH	« Gonadotropin-releasing hormone »
GnRHR	« Gonadotropin-releasing hormone receptor »
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GSU	Sous-unité glycoprotéique
HAT	Histone acétyltransférase
HPA	Axe corticotrope ou hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien
HRP	« Horseradish peroxidase »
IAA	« Iodoacétamide »
IgG	Immunoglobuline G
IPG	« Immobilized pH gradient »
JAK	« Janus kinase »
JP	« Joining peptide »

K1 Tag	« K1 T-antigen »
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LH	Lutropine ou « luteinizing hormone »
LIF	« Leukimia inhibitory factor »
LIFR	« Leukimia inhibitory factor receptor »
LPH	Hormone lipotropine
LTR	« Long terminal repeat »
Lys	Lysine
M (Met)	Méthionine
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MBP	« Maltose-binding protein »
MCR	« Melanocortin receptor »
MEK (MAPKK)	« Mitogen-activated protein kinase kinase »
mg	Milligramme
MOPS	acide 4-morpholinepropanesulfonique
MSH	Mélanostimuline ou « melanocyte-stimulating hormone »
MW	Poids moléculaire
N-	Amino
NBRE	Élément monomérique de réponse aux facteurs Nur
NeuroD1	« Neurogenic differentiation factor 1 »

nGRE	Élément négatif de réponse aux glucocorticoïdes
NID	Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires
NOR-1	« Neuron-derived orphan receptor 1 »
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nucléotide
Nur77 (NGFI-B)	« Nerve growth factor inducible-clone B »
Nurr1	« Nur-related factor 1 »
NurRE	Élément dimérique de réponse aux facteurs Nur
OMB	« Optomotor-blind »
OT	Ocytocine
Pan1/2	« Pancreas protein 1/2 »
PAS	Domaine Per/Arnt/Sim
PBS	Tampon salin phosphate
PC	Prohormone convertase
p/CAF	« p300/CBP associated protein »
PCR	« Polymerase chain reaction »
PCRH-RE	« Proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive element »
PCRH-REB1	« Proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive element binding protein 1 »
PE	Élément proximal
PGC-1	« PPAR- γ coactivator 1 »

pH	« Power of hydrogen »
pI	Point isoélectrique
Pitx1	« Pituitary homeobox 1 »
Pit-1	« Pituitary-specific positive transcription factor 1 »
PKA	Protéine kinase A
PKI	Inhibiteur de protéine kinase A
PMSF	Phénylméthylsulphonyl fluoride
POMC	Pro-opiomélanocortine
PPI	« Putative pituitary POMC 1 »
PR	Récepteur de la progestérone
PRL	Prolactine
PRP	« Prolactin-releasing peptide »
PVN	Noyau paraventriculaire
Q	Glutamine
RE	Élément de réponse
RID	Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires
rpm	Rotation par minute
RSV	« Rous sarcoma virus »
S (Ser)	Sérine
S	Soufre

SDS	Sodium dodécyl sulphate
SF-1	« Steroidogenic factor 1 »
Smad	« Sma/Mothers Against Decapentaplegic »
Sp1	« Specific protein 1 »
SRA	« Steroid receptor RNA activator »
SRC	« Steroid receptor coactivator »
STAT	« Signal transducer and activator of transcription »
SV-40	« Simian virus 40 »
T	Thymine
T (Thr)	Thréonine
Tbr1	« T-brain 1 »
Tbx	« T-box factor »
TGF	« Transforming growth factor »
Tpit	« Pituitary T-box »
Tpit/Pitx-RE	Élément de réponse à Tpit et Pitx1
TR	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
TRE	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	« Thyrotropin-releasing hormone »
TSH	Thyréotropine ou « thyroid-stimulating hormone »
VIP	« Vasoactive intestinal peptide »

WCE

Extraits cellulaires protéiques totaux

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord dire un gros merci à mon entourage proche, et plus spécialement à mes parents Ginette et Michel qui m'ont toujours encouragé dans mon cheminement et qui ont bien voulu me soutenir financièrement tout au long de mes études. Merci...

J'aimerais également remercier mon directeur de laboratoire Jacques Drouin pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses nombreux conseils et commentaires qui ont certainement contribué à faire de moi une future assistante de recherche compétente. Merci...

Je remercie Anne-Marie Pulichino et Mario Maira qui m'ont si généreusement offert leur aide lors de mon premier stage d'été et au début de maîtrise et qui sont devenus de bons amis au fil du temps. Merci...

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leurs bonnes réponses à mes nombreuses questions et pour leur soutien. Je remercie particulièrement mes collègues et amies Sophie Vallette et Aurore l'Honoré pour les distrayants petits cafés entre « cocottes » ainsi que les petits comiques du laboratoire pour les moments de divertissement qui ont fortement contribué à ma bonne humeur et agrémenté mon passage dans le laboratoire. Merci...

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Le stress... qui n'a jamais prononcé ce mot? Il est sur les lèvres de tous les québécois du 21^{ème} siècle, mais il y existe déjà depuis un certain temps. C'est Hans Selye, un des pionniers de la recherche sur le sujet, qui a inventé le terme il y a de cela à peine plus d'un demi-siècle. Il venait de donner un nom à un phénomène qui existe depuis la nuit des temps. Dans la préhistoire, l'homme des cavernes en avait besoin pour trouver l'énergie de fuir devant le mammouth enragé. La réponse de l'organisme face au danger était donc une question de vie ou de mort, le stress aigu avait ses bienfaits. Cependant, cette réponse plutôt archaïque n'est plus adaptée à nos conditions de vie actuelles. Pour l'homme moderne, le stress est devenu une véritable épidémie, un problème de société. De nombreuses pathologies sont associées au stress chronique causé par le rythme infernal de la vie d'aujourd'hui. C'est pour cette raison que de nombreuses études médicales et scientifiques ont été effectuées sur un des principaux systèmes de contrôle du stress, l'axe neuroendocrinien corticotrope. Mon groupe de recherche s'intéresse à un élément important de cet axe, soit la régulation de la transcription hypophysaire du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC). Les prochains paragraphes introduisent mes travaux de maîtrise et vont donc traiter de l'axe corticotrope, de l'hypophyse ainsi que du gène de la POMC et des mécanismes moléculaires et signaux qui le régulent.

1.1 L'axe neuroendocrinien corticotrope

L'axe neuroendocrinien corticotrope, ou axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (axe HPA), relie fonctionnellement l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales (Figure 1.1). Il participe principalement au maintien de l'homéostasie et médie la réponse au stress chez l'adulte. Son fonctionnement est basé sur un système

de communication à relais qui repose sur l'utilisation d'hormones et dans lequel chacune des étapes peut être régulée, ce qui assure une activation ou une inhibition rapide de l'axe. Ainsi, lorsque l'organisme est soumis à un stress, l'hypothalamus sécrète la CRH (corticotropin releasing hormone) qui stimule la production hypophysaire de POMC, précurseur de l'adrénocorticotropine (ACTH) qui cause à son tour la synthèse de glucocorticoïdes (Gc) par les glandes surrénales. Enfin, les Gc agissent à différents niveaux pour modifier le métabolisme et rétablir l'équilibre physiologique.

L'hypothalamus origine du neuroectoderme et est composé de neurones. L'hypophyse est, pour sa part, une glande qui dérive de l'ectoderme oral et contient six lignées cellulaires distinctes. Au cours de l'embryogenèse, un lien étroit est maintenu entre le cerveau et la glande. L'hypothalamus est directement relié à la partie postérieure de l'hypophyse par les projections axonales de ses neurones. Le contact avec la section antérieure de l'hypophyse est assuré par un système sanguin particulier, le système port hypophysaire, qui est alimenté par l'artère hypophysaire supérieure (reliée à la carotide interne). Ainsi, des petits capillaires à la base du cerveau reçoivent les hormones hypothalamiques qui sont déversées dans les veines du système port hypophysaire et qui rejoignent ensuite les nombreux vaisseaux particulièrement poreux qui irriguent l'hypophyse et facilitent la libération des peptides (Flerko 56-63;Page E427-E442). C'est la mise en fonction de ce système sanguin qui complète la formation d'un axe fonctionnel peu de temps avant la naissance, soit autour du jour embryonnaire 15 (e15) chez la souris. Le lien dans la deuxième portion de l'axe, soit entre l'hypophyse et les glandes surrénales, est assuré par la circulation sanguine générale.

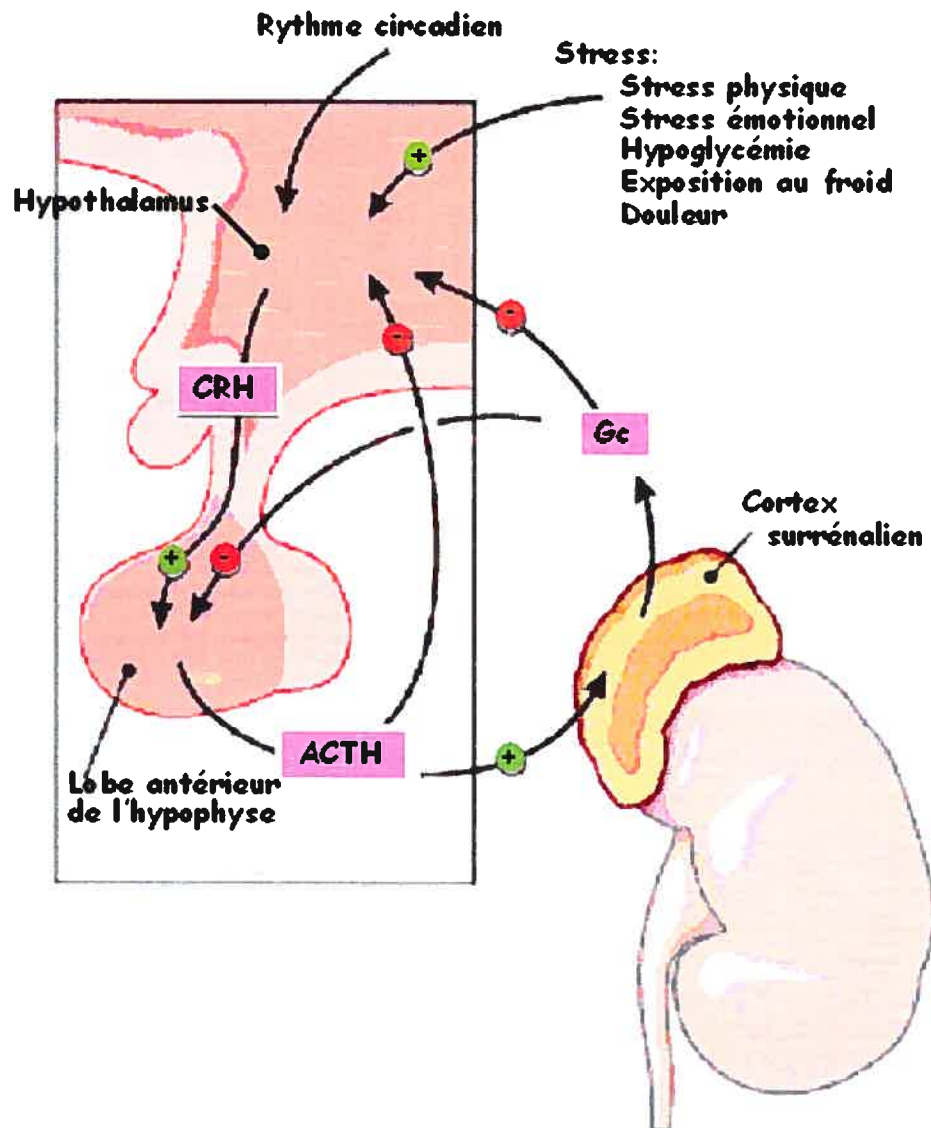


Figure 1.1 Axe neuroendocrinien hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. L'hormone hypothalamique CRH stimule la sécrétion hypophysaire d'ACTH. L'ACTH induit à son tour la relâche de glucocorticoïdes par les glandes corticosurrénales. L'ACTH et les glucocorticoïdes sécrétés contrôlent à leur tour l'axe via des boucles de rétroinhibition qui agissent sur les niveaux supérieurs.

1.1.1 L'hypophyse et l'ACTH au centre de l'axe

L'hypophyse est l'exemple de glande endocrine « véritable » par excellence car elle est spécialisée uniquement dans la production et la sécrétion d'hormones. Ce petit organe, pas plus gros qu'un petit pois d'environ 600 mg chez l'homme, est situé à l'intersection de deux lignes imaginaires, l'une reliant les deux oreilles et l'autre rejoignant le derrière de la tête en partant au-dessus du nez. À cet endroit précis à la base du cerveau se trouve une petite cavité osseuse appelée selle turcique dans laquelle loge l'hypophyse.

L'hypophyse est divisée en deux parties qui se distinguent principalement par leur origine embryonnaire et par les types cellulaires qui les composent et qui spécifient leur fonction. Ces deux parties sont la neurohypophyse et l'adénohypophyse.

La neurohypophyse, aussi appelée lobe postérieur, est formée à partir du neuroectoderme. Exempte de cellules endocrines, elle est majoritairement composée des terminaisons axonales des neurones neurosécréteurs magnocellulaires siégeant dans les noyaux paraventriculaire (PVN) et supraoptique de l'hypothalamus. Des cellules gliales, appelées pituicytes, font aussi partie de ce lobe et sont dispersées entre les neurones neurosécrétoires. Elles agissent à titre de cellules de support mais jouent aussi un rôle de régulateur. Le lobe postérieur ne produit aucune hormone par lui-même, mais joue un rôle important dans la relâche des hormones hypothalamiques AVP (vasopressine, hormone anti-diurétique) et ocytocine qui sont produites dans le corps cellulaire des neurones et qui sont ensuite transportées le long des axones à l'intérieur de la tige pituitaire jusqu'au lobe postérieur où elles sont stockées. Lorsque la sécrétion est nécessaire, les pituicytes se rétractent afin de libérer les terminaisons nerveuses permettant ainsi le déversement des hormones dans la circulation sanguine (Theodosius)

and Poulain 175-82). L'AVP agit sur trois récepteurs différents : les récepteurs V1-vasculaire et V2-rénal stimulés augmentent la pression sanguine et la réabsorption de l'eau respectivement tandis que le récepteur V3-hypophysaire est impliqué dans la régulation de la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes de l'hypophyse (de Keyzer et al. 259-62; Binkley). L'ocytocine stimule les contractions de l'utérus afin de déclencher le processus d'accouchement, et stimule également les cellules myoépithéliales des glandes mammaires pour permettre l'écoulement du lait en post-partum (Hadley; Binkley).

L'adénohypophyse contient deux lobes importants : les lobes intermédiaire et antérieur. Le lobe intermédiaire existe chez la plupart des mammifères et n'est composé que d'un seul type cellulaire, les cellules mélanotropes, qui produisent principalement l' α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) (Saland 587-93). Cette hormone stimule la production par les mélanocytes de mélanine, un pigment brunâtre qui est responsable de la coloration de la peau et du poil. C'est pour cette raison que le lobe intermédiaire est particulièrement développé chez les animaux qui s'adaptent à la couleur de leur environnement pour se camoufler (Tonosaki et al. 894-905). Chez l'humain, ce même lobe existe temporairement dans le fœtus, mais disparaît durant la vie foetale pour être absent dans l'hypophyse adulte. Ainsi, la régulation de la pigmentation se fait localement par les mélanocytes de la peau et des poils (Tonosaki et al. 894-905; Tsatmali, Ancans, and Thody 125-33).

Le lobe antérieur contient cinq types cellulaires différents qui sécrètent six hormones. Celles-ci sont produites et sécrétées en réponse à divers signaux hypothalamiques et agissent spécifiquement sur des organes cibles.

Les cellules thyroïdiques représentent moins de 10% des cellules de la glande et produisent la thyroïdostimuline (TSH, thyroid-stimulating hormone). Cette hormone glycoprotéique est constituée d'une sous-unité alpha (α GSU) commune aux hormones gonadotropines LH et FSH, et d'une sous-unité bêta qui lui procure sa spécificité. La TSH stimule la production par la glande thyroïde des hormones thyroïdiennes T3 (triiodothyronine) et T4 (thyroxine) qui agissent sur la croissance, le développement, la reproduction, le métabolisme basal et même sur le comportement. La TSH est régulée positivement par le signal hypothalamique TRH (thyrotropin-releasing hormone) et négativement par la boucle de rétroaction complétée par T3 et T4 (Persani 941-46).

Les cellules gonadotropes représentent 10 à 15% des cellules de l'adénohypophyse. Elles sécrètent deux hormones glycoprotéiques, les gonadotropines folliculostimulante (FSH, follicle-stimulating hormone) et lutéinisante (LH, luteinizing hormone) qui agissent sur les testicules et les ovaires. La FSH contrôle la spermatogenèse chez l'homme et le développement précoce du follicule ovarien chez la femme. La LH déclenche l'ovulation et joue un rôle dans le développement du corps jaune qui produit la progestérone. De plus, la LH stimule la sécrétion des hormones sexuelles, soit la testostérone chez l'homme et les oestrogènes chez la femme. La production des gonadotropines par les cellules gonadotropes est stimulée principalement par le signal hypothalamique GnRH (gonadotropin-releasing hormone) tandis que les stéroïdes gonadiques l'inhibent via une boucle de rétroaction négative. Deux autres molécules également produites par les gonades, l'activine et l'inhibine, régulent positivement et négativement la synthèse de la FSH essentiellement (Ooi, Tawadros, and Escalona 1-21; Ooi, Tawadros, and Escalona 1-21; Pawson and McNeilly 75-94).

Les cellules lactotropes produisent la prolactine (PRL) également nommée « hormone de la maternité » puisque son rôle principal est de stimuler la lactation chez la femme enceinte et allaitante, situation pendant laquelle le nombre de ce type de cellules est augmenté. La PRL est régulée négativement par la dopamine hypothalamique et positivement par la TRH, le VIP (vasointestinal peptide), la PRP (prolactin-releasing peptide) et les oestrogènes (Samson, Taylor, and Baker 1-5; Voogt et al. 173-85).

Les cellules somatotropes constituent plus de la moitié de l'hypophyse antérieure. L'hormone de croissance (GH, growth hormone) qu'elles sécrètent régule la croissance de façon directe et indirecte en stimulant la production hépatique de somatomédines qui agissent sur la croissance des os, des muscles squelettiques et d'autres organes. La GHRH (growth hormone releasing hormone) et la somatostatine sont toutes les deux relâchées par l'hypothalamus et exercent respectivement un effet positif et négatif sur la production de GH (Muller, Locatelli, and Cocchi 511-607).

Finalement, les cellules corticotropes complètent la population du lobe antérieur de l'hypophyse. Ce type cellulaire est au centre de l'axe corticotrope. Elles sécrètent l'adrénocorticotropine (ACTH, adrenocorticotropin hormone) à partir de e12.5 suite au clivage du précurseur pro-opiomélanocortine (POMC) qu'elles produisent. Cette étape de maturation de la pro-hormone POMC sera discutée en détail dans la section 1.2. L'ACTH sécrétée régule la production de glucocorticoïdes par les glandes surrénales qui contribuent au maintien de l'homéostasie et à la réponse au stress. La production d'ACTH est stimulée principalement par le signal hypothalamique CRH (corticotropin-releasing hormone) alors que les glucocorticoïdes l'inhibent via une boucle de rétroinhibition (Figure 1.1). Ces signaux seront discutés dans les sections 1.3.3.3 et 1.3.3.4.

1.1.2 L'hypothalamus et la CRH au sommet de l'axe

L'hypothalamus, qui siège au sommet de l'axe, est la partie du diencephale située tout juste sous le thalamus et sécrète l'hormone hypophysiotrope CRH. La CRH est un neuropeptide de 41 acides aminés dont l'existence a été démontrée au début des années 1950 par Hans Selye qui l'avait d'abord nommé « le premier médiateur de la réponse au stress ». En fait, la CRH a véritablement été caractérisée une trentaine d'années plus tard en 1981 par W. Vale et al.. Ce peptide est décrit comme un puissant sécrétagogue, et par le fait même, il est le principal facteur physiologique responsable de la relâche hypophysaire de l'ACTH. L'AVP peut aussi stimuler la sécrétion d'ACTH, mais à un faible niveau seulement. En fait, son action est plutôt d'amplifier l'activité de la CRH, donnant ainsi encore plus d'importance à cette dernière hormone (Gillies, Linton, and Lowry 355-57; Abou-Samra et al. 67-84; Debold et al. 533-38; Rivier et al. 882-86; Bilezikjian and Vale 85-96). En condition basale, la sécrétion de la CRH est pulsatile et soumise au contrôle du cycle circadien. Lorsqu'un stress se présente, la production et la sécrétion de la CRH s'intensifient. Cette hormone est synthétisée par un sous-ensemble de neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire dont les projections rejoignent la couche externe de l'éminence médiane. C'est à cet endroit que la CRH est déversée dans le système sanguin porte hypophysaire qui la transporte ensuite vers le lobe antérieur où elle peut lier son récepteur CRH-R1, un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G qui, dans l'hypophyse antérieure, est exprimé à la surface des cellules corticotropes uniquement. La liaison de l'hormone peptidique à son récepteur induit différentes cascades de signalisation intracellulaires (discutées dans la section 1.3.3.4) qui convergent au niveau du promoteur de la POMC afin de moduler positivement son activité transcriptionnelle. Ainsi, la transcription du gène de la POMC est augmentée de

même que la biosynthèse et la sécrétion de l'ACTH obtenue suite à la maturation protéolytique de la POMC. L'ACTH libérée entre dans la circulation sanguine pour atteindre ses cibles principales, les glandes corticosurrénales, et lier son récepteur couplé à la protéine G. La stimulation de ce récepteur active l'adénylate cyclase et par conséquent, amène une augmentation de la concentration d'AMP cyclique (AMPc), qui stimule la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA). Cette cascade mène à l'activation d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse et par conséquent, dans certaines étapes de la synthèse des glucocorticoïdes, effecteurs terminaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien.

1.1.3 Les glandes surrénales et les glucocorticoïdes au bas de l'axe

Les glandes surrénales sont séparées en deux parties, soit la partie centrale (médullosurrénale) et la partie périphérique (corticosurrénale). La corticosurrénale est divisée en trois sections allant du pourtour vers l'intérieur, dont la section centrale nommée zone fasciculaire est responsable de la sécrétion de glucocorticoïdes. Le but premier de la production et de la sécrétion des glucocorticoïdes est de maintenir l'homéostasie et de médier une réponse physiologique adéquate en réponse au stress. Les Gc agissent sur le métabolisme en augmentant la synthèse de glycogène et la gluconéogenèse à partir des protéines musculaires. De plus, ils ont un effet catabolique puisqu'ils affectent la redistribution des graisses, la destruction des protéines, l'augmentation d'excrétion urinaire d'azote, la résorption osseuse et favorisent l'épargne du glucose. Les Gc ont aussi des actions anti-inflammatoire et anti-allergique en plus de réduire la réponse immunologique à une infection et d'altérer faiblement la rétention d'eau et de sodium.

Par ailleurs, les glucocorticoïdes jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'activité basale de l'axe corticotrope et dans l'arrêt de la réponse au stress. En effet, ils effectuent une boucle de rétroinhibition qui est nécessaire pour limiter l'exposition des organes aux effets dommageables (effets catabolique, lipogénique, antireproductif et immunosuppresseur) des Gc eux-mêmes. Seul un stress « neurogénique » sévère ou un fort signal CRH peut bloquer cette boucle afin de maintenir l'activité de l'axe. Les Gc sécrétés agissent aux deux niveaux supérieurs de l'axe HPA afin de diminuer la sécrétion et la transcription de CRH hypothalamique et d'ACTH hypophysaire (Figure 1.1). Le mécanisme de rétroaction négative est médié par la liaison des glucocorticoïdes sur leur récepteur GR (glucocorticoid receptor) de type II, le récepteur classique qui répond aux concentrations autant basales qu'élevées (en situation de stress) de glucocorticoïdes sanguins (Charmandari, Tsigos, and Chrousos 259-84). Le complexe récepteur (GR)-ligand (Gc) quitte le cytoplasme, migre dans le noyau où il peut atteindre son gène cible POMC et réprimer activement la transcription, c'est-à-dire en se liant directement au promoteur sur ses éléments de réponse spécifiques, ou agir par un mécanisme de transrépression en bloquant l'activité de protéines déjà liées au promoteur via des interactions protéine-protéine.

1.1.4 Modèles murins d'axe corticotrope non-fonctionnel

Le dérèglement de l'axe corticotrope peut mener à différentes conditions pathologiques qui, lorsqu'elles ne sont pas traitées, peuvent s'avérer fatales. Chez l'humain par exemple, la maladie de Cushing est causée par la formation d'une tumeur corticotrope qui amène une hypersécrétion d'ACTH et conséquemment, un surplus de glucocorticoïdes. Un autre exemple est le syndrome de Carney qui est causé par des

nodules pigmentés des corticosurrénales qui mène directement à l'hypercorticisme. De nombreuses invalidations géniques générées chez la souris et discutées dans les paragraphes suivants reflètent également l'importance de chacune des étapes qui composent l'axe.

1.1.4.1 La souris CRH-/-

Les souris invalidées pour le gène de la CRH et issues de parents hétérozygotes sont viables et présentent un phénotype tout à fait normal. Cette absence de phénotype marqué s'explique par le fait que la mère fournit les Gc manquants, qui compensent pour le faible niveau dans l'embryon. Contrairement aux souris contrôles, ces souris ne présentent pas d'augmentation drastique du niveau de glucocorticoïdes sanguins lorsqu'elles sont soumises à un test de réponse au stress. De plus, le niveau normal d'ARNm de POMC montre que la stimulation par la CRH n'est pas essentielle à la transcription du gène. Le bas niveau d'ACTH sanguin suggère cependant que la CRH est nécessaire à la sécrétion. D'autre part, les souris provenant du croisement entre deux souris CRH-/- meurent rapidement après la naissance d'insuffisance respiratoire due à un défaut de maturation des poumons, puisque la faible sécrétion de Gc par les corticosurrénales atrophiées entraîne une diminution du niveau d'ARNm de surfactant pulmonaire et conséquemment, l'atélectasie pulmonaire puisque cette protéine est exprimée à l'interface air-eau des alvéoles et est nécessaire pour prévenir l'adhésion des surfaces respiratoires (Foot, Orgeig, and Daniels; Berger et al. 480-87; Fu et al. 450-53). La supplémentation en Gc de la mère pendant la gestation renverse le phénotype et les nouveaux-nés sont viables (Muglia et al. 427-32; Venihaki and Majzoub 96-102; Venihaki and Majzoub 122-45; Muglia et al. 725-31).

1.1.4.2 La souris CRHR-/-

Il existe deux récepteurs CRHR, soit CRHR1 et CRHR2 qui sont codés par deux gènes différents et ont des propriétés totalement distinctes. Seul CRHR1 est exprimé à la surface des cellules corticotropes. CRHR2 est aussi exprimé dans l'hypophyse, mais certains groupes proposent que son expression principale serait vasculaire. Par conséquent, CRHR1 a été identifié comme étant le principal médiateur de l'activation de l'axe corticotrope dans la réponse au stress. Malgré tout, les souris CRHR2-/- montrent une interruption précoce de la sécrétion d'ACTH ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle secondaire dans la régulation de la réponse à la CRH. À l'inverse, la souris CRHR1-/- présente un phénotype plus marqué caractérisé par une hypoplasie des glandes surrénales et une absence de réponse au stress reflétée par l'absence d'élévation des niveaux d'ACTH et de Gc sanguins. Puisque les niveaux de Gc sont affectés, les souris nées d'un croisement de deux souris homozygotes CRHR1-/- meurent très tôt après la naissance d'une insuffisance respiratoire de la même façon que les souris CRH-/- (Preil et al. 4946-55; Muller et al. 4150-53).

1.1.4.3 La souris POMC-/-

Les souris invalidées pour le gène de la POMC présentent un défaut dans la maturation des poumons qui cause la mort rapidement après la naissance puisque les glucocorticoïdes sanguins sont indétectables. Contrairement à la souris CRH-/-, la supplémentation en Gc de la mère pendant la gestation ne renverse pas le phénotype. Cela pourrait s'expliquer par une déficience combinée en Gc et en épinéphrine puisque les glandes surrénales (corticosurrénales et médullosurrénales également) sont hypoplasiques et dysfonctionnelles. La souris présente aussi un défaut de pigmentation de

la fourrure et un surplus de poids, problèmes qui pourraient s'expliquer par l'absence de POMC cutanée et hypothalamique respectivement (Smart and Low 202-10; Yaswen et al. 1066-70).

1.1.4.4 La souris GR-/-

Les souris GR-/- meurent en quelques heures après la naissance par insuffisance respiratoire puisqu'elles présentent un défaut de développement des poumons au jour e15.5. L'axe corticotrope est sévèrement affecté puisqu'il n'y a plus de rétroinhibition possible, ce qui entraîne un taux élevé d'ACTH et de glucocorticoïdes sanguins et une hypertrophie du cortex surrénalien. Les autres problèmes sont l'absence de la partie médullosurrénale, la capacité réduite du foie à activer les enzymes de la gluconéogenèse et différents défauts du système immunitaire (Cole et al. 1608-21).

1.2 La pro-opiomélanocortine

La synthèse de la prohormone pro-opiomélanocortine (POMC) est au centre de l'axe neuroendocrinien corticotrope. Malgré le fait que le gène de la POMC a initialement été découvert dans les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure, son expression est détectée dans différents tissus. Ce gène donne naissance au précurseur POMC qui, une fois clivé, génère plusieurs petits peptides différents. D'ailleurs, ces peptides obtenus suite à la maturation varient d'un tissu à l'autre et ont des fonctions biologiques distinctes, ce qui fait de la POMC un peptide précurseur d'importance.

1.2.1 La structure du gène POMC hypophysaire

Le clonage du gène POMC a été fait dans différentes espèces. Dans le génome humain, le gène POMC est situé sur le chromosome 2p23.3 et fait 8 kilobases (kb), grandeur qui peut varier selon les espèces. L'étude de l'organisation du gène ainsi que le séquençage complet obtenu en 1983 ont montré que sa structure est fortement similaire chez l'humain (Takahashi et al. 97-102), le bovin (Nakanishi et al. 423-27), le rat (Drouin et al. 54-58) et la souris (Uhler and Herbert 257-61). Il est composé de trois exons (exons 1, 2 et 3) séparés par deux grands introns (introns A et B). Le premier exon, le plus court des trois, correspond à la majeure partie de la région 5' non-traduite du gène. Cette séquence sert principalement à la liaison de ribosomes afin de faciliter l'initiation de la traduction. L'exon 2 comprend la partie de la région 5' non-traduite complémentaire à celle de l'exon 1, suivie du site d'initiation de la traduction. L'autre portion du deuxième exon code pour un peptide signal, essentiel au transport de la prohormone à travers le réticulum endoplasmique rugueux, et pour les premiers acides aminés de la région N-terminale. Le plus gros des exons, l'exon 3, contient la majorité de la séquence codante et donne donc naissance aux principaux peptides dérivés de la POMC. Il contient aussi la partie 3' non-traduite du gène. Les deux introns, intercalés entre les trois exons, comptent pour plus de la moitié du gène (Newell-Price 365-72; Oates and Herbert 7421-25).

Trois promoteurs ont été décrits dans la structure du gène POMC. La principale différence entre ceux-ci est le site où ils sont actifs. Le premier, le promoteur 5', est localisé en 5' de l'exon 1. C'est lui qui régule la transcription des ARNm de 1150 nt dans les cellules corticotropes hypophysaires et les neurones POMC de l'hypothalamus chez l'humain. Étant donné qu'il est d'intérêt principal dans ce mémoire, sa régulation sera discutée en profondeur dans la section suivante (section 1.3). Le deuxième promoteur est

situé en amont du promoteur 5'. Il génère donc majoritairement le même transcrit ainsi qu'une petite quantité d'une forme plus longue de 1350 nt qui est fréquemment retrouvée dans des tumeurs non-hypophysaires qui expriment POMC et sécrètent l'ACTH (Newell-Price 365-72). Le troisième, nommé promoteur 3', se situe dans l'intron B juste en amont de l'exon 3. Il donne naissance à une très faible quantité d'un transcrit tronqué qui se retrouve dans une panoplie de tissus, mais dont les peptides obtenus ne sont vraisemblablement pas sécrétés (Clark et al. 1737-43).

1.2.2 La maturation de la POMC

La synthèse de la pré-POMC à partir de l'ARNm de 1150 nt se fait dans le réticulum endoplasmique granulaire et génère un peptide ayant une masse moléculaire d'environ 30 kilodaltons (kDa). Une fois produite par les ribosomes, la pré-POMC transloque à travers la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et est ensuite reconnue grâce à son peptide signal en N-terminal. Cette petite séquence contient quatre cystéines nécessaires à la formation de deux ponts disulfures qui servent à la stabilisation d'une boucle amphipatique. Ce motif se lie à une protéine membranaire exprimée au niveau des vésicules de transport, la carboxypeptidase E. Quatre autres acides aminés conservés du peptide signal semblent également jouer un rôle dans les interactions ioniques et hydrophobes avec ce même récepteur (Cool et al. 8723-29; Rindler 31180-85; Loh et al. 416-25). Une fois cette reconnaissance effectuée, le peptide signal est rapidement clivé et la POMC est par la suite transportée dans l'appareil de golgi pour ultimement rejoindre les granules de sécrétion. Différentes étapes de maturation prennent

place tout au long de ce trajet puisque plusieurs enzymes protéolytiques y sont exprimées et permettent la production des nombreux peptides dérivés de la POMC.

Tout d'abord, des endoprotéases, les prohormones convertases PC1 (aussi nommée PC3) et PC2, coupent la POMC à des endroits spécifiques marqués par des paires d'acides aminés basiques (lysine et arginine). En tout, on compte huit paires et un quadruplet d'acides aminés basiques qui peuvent être ciblés en différentes combinaisons dépendant du tissu et des enzymes qui y sont exprimées. Lorsque le clivage est terminé et que les petits fragments sont obtenus, les doublets d'acides aminés basiques en C-terminal sont enlevés par la carboxypeptidase E. Par la suite, afin de diversifier, de spécifier ou d'altérer la fonction biologique des peptides obtenus, d'autres modifications chimiques telles que la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation et l'amidation leur sont ajoutées (Castro and Morrison 35-57). Finalement, les granules de sécrétion qui auront atteint la maturité vont pouvoir relâcher, en réponse à une stimulation, les peptides actifs dans la circulation sanguine (Loh et al. 416-25; Raffin-Sanson, de Keyser, and Bertagna 79-90; Smith and Funder 159-79).

1.2.3 Les peptides POMC

Comme mentionné plus tôt, la maturation du peptide POMC se fait différemment d'un tissu à l'autre en fonction des prohormones convertases exprimées. Dans l'hypophyse, on retrouve les deux prohormones convertases PC1 et PC2. Les cellules corticotropes du lobe antérieur expriment essentiellement PC1 qui possède une activité protéolytique réduite. Les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire ont quant à elles les deux proconvertases (PC1 et PC2) qui combinent leur fonction et produisent de multiples fragments de petite taille en coupant à tous les sites. Ainsi, trois sites sont

préférentiellement clivés par la PC1, afin d'obtenir l'ACTH et la β -lipotropine (β -LPH) de même qu'un grand fragment N-terminal (N-term) et le peptide JP (joining peptide). Par la suite, PC2 fait quelques clivages qui génèrent les peptides supplémentaires γ -MSH (à partir du peptide N-terminal), α -MSH et CLIP (Corticotrophin-like intermediate lobe peptide) (à partir de l'ACTH), ainsi que γ -LPH et β -endorphine (à partir de la β -LPH). Un dernier clivage de γ -LPH produit la β -MSH (Raffin-Sanson, de Keyzer, and Bertagna 79-90; Smith and Funder 159-79; Benjannet et al. 3564-68; Zhou, Bloomquist, and Mains 1763-69). La figure 1.2 représente les différents peptides dérivés de POMC. Tous ces peptides, sauf la β -endorphine, sont collectivement appelés mélanocortines. La β -endorphine (β -end) fait partie de la famille des peptides opioïdes.

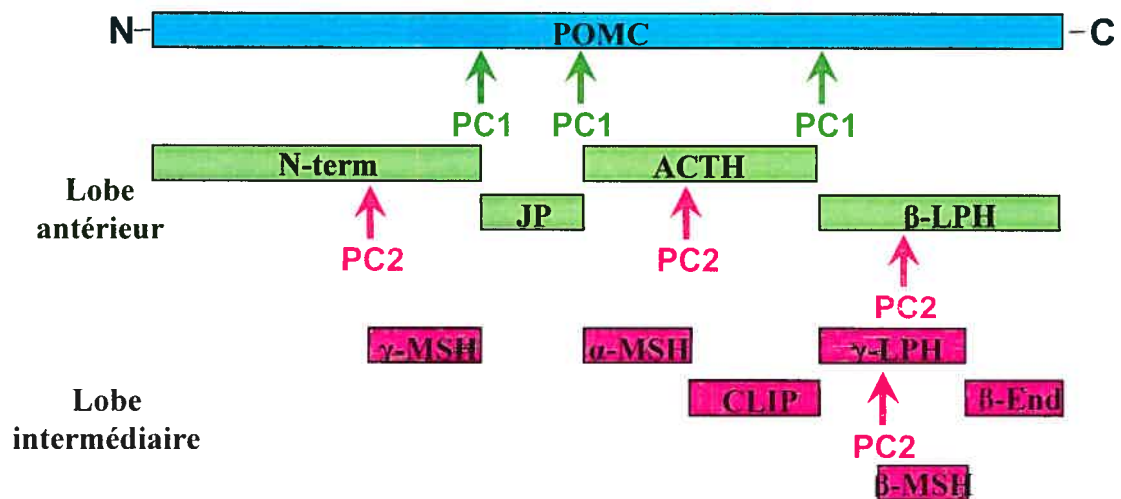


Figure 1.2 Clivage de la POMC dans l'hypophyse. Dans le lobe antérieur, PC1 produit un fragment N-terminal, le peptide JP, l'ACTH et la β -LPH. Dans le lobe intermédiaire, PC2 coupe à quatre sites supplémentaires afin de générer l' α - et la γ -MSH, CLIP, la β -end et la γ -LPH qui est clivée à nouveau pour donner la β -MSH.

1.2.4 Sites d'expression des peptides POMC et leurs principales fonctions

La POMC et ses peptides dérivés se retrouvent dans une panoplie de tissus incluant l'hypophyse, le cerveau et la peau qui sont les principaux ainsi que les poumons, la rate, le système immunitaire, la glande thyroïde, le pancréas, les glandes surrénales, le placenta, l'utérus et les gonades. Cependant, leur fonction dans chacun de ces sites n'est pas toujours connue (Raffin-Sanson, de Keyzer, and Bertagna 79-90; DeBold, Nicholson, and Orth 2648-57). En général, la fonction du peptide dépend du récepteur auquel il se lie. Il existe cinq récepteurs à sept domaines transmembranaires (soit MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, et MC5R) disponibles pour exercer la fonction biologique des mélanocortines et trois récepteurs (μ , κ , et δ) pour celui des peptides opioïdes (Hadley and Haskell-Luevano 1-21; Chhajlani 73-80; Holden, Jeong, and Forrest 291-301).

Chez l'humain, la POMC est principalement exprimée au niveau de l'hypophyse et plus précisément dans les cellules corticotropes du lobe antérieur. Le produit majoritaire obtenu après maturation de la POMC est l'ACTH qui, une fois libérée dans la circulation sanguine, rejoint et lie avec une forte affinité les récepteurs MC2R des glandes surrénales afin de réguler la stéroïdogenèse, et par le fait même la sécrétion des glucocorticoïdes, ainsi que la croissance de ces glandes. Le peptide α -MSH peut aussi être libéré par les cellules mélanotropes, mais seulement chez les mammifères où le lobe intermédiaire est présent dans l'hypophyse adulte. Chez l'humain cependant, l' α -MSH est produite localement par le clivage de la POMC cutanée. L' α -MSH lie le récepteur MC1R des cellules de la peau et stimule la synthèse des pigments responsables de la coloration cutanée. Dans certaines conditions pathologiques cependant, le MC1R peut être lié par de nombreux autres ligands. Ainsi, dans le syndrome de Nelson ou la maladie d'Addison, la surproduction des autres peptides ACTH, β -LPH et γ -LPH cause une

stimulation excessive du récepteur MC1R et une hyperpigmentation chez les patients. Malgré tout, la production cutanée de POMC est importante puisqu'elle constitue un système local de réponse au stress. Un système similaire à l'axe neuroendocrinien corticotrope a d'ailleurs été écrit dans les cellules de la peau (Slominski et al. 979-1020;Bohm and Luger 16-21;Rouzaud et al. 133-52). Parallèlement, les mélanocortines de la peau peuvent aussi lier le récepteur MC5R pour produire un effet totalement différent, soit la stimulation de la sécrétion des glandes sébacées (Zhang et al.).

Un autre site d'expression de la POMC se situe au niveau du cerveau. La POMC est principalement exprimée dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus où sa maturation est similaire à celle observée dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire de l'hypophyse. Le peptide principal obtenu suite au clivage de la POMC hypothalamique est l' α -MSH qui se lie aux deux récepteurs MC3R et MC4R. Ensemble, ils ont des effets complémentaires visant le contrôle du poids. MC3R régule notamment le niveau de masse grasse en diminuant l'efficacité nutritive des aliments tandis que le rôle de MC4R est plutôt d'inhiber la prise alimentaire. Selon des travaux de recherche récents, la β -MSH pourrait être un ligand du MC4R de la même façon que l' α -MSH et effectuer une fonction dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Harrold, Widdowson, and Williams 397-405).

Différentes fonctions ont aussi été décrites pour quelques autres peptides dérivés de la POMC. Une sérine protéase nommée AsP et spécifique au cortex surrénalien produit une forme plus courte du peptide N-terminal qui aurait un effet mitogène puisqu'il maintient une prolifération cellulaire soutenue dans les glandes surrénales suite à sa liaison à un récepteur transmembranaire (Raffin-Sanson, de Keyzer, and Bertagna 79-90;Bicknell 309-14). Le peptide CLIP jouerait pour sa part un rôle dans la régulation

du sommeil paradoxal (Wetzel et al. 237-41). Le peptide JP aurait une fonction potentielle dans la modulation de la synthèse d'androgènes par les glandes surrénales (Clarke et al. 301-07). La β -endorphine produite par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus exercerait un effet analgésique via la liaison des récepteurs aux opioïdes. Également, certaines expériences effectuées chez le rat démontrent une action natriurétique de la γ -MSH (Chen et al. R1946-R1953). De plus, la détection de ce même peptide dans des régions de régulation cardiovasculaire, soit les neurones POMC des noyaux arqué et commisural dont les projections innervent les centres vasomoteurs du cerveau antérieur, suggère une implication dans la fonction cardiaque (Solomon 22-40; Gruber and Callahan Pt 2):R681-94).

1.3 Régulation de la transcription du gène POMC

Comme mentionné précédemment, l'expression du gène POMC est détectée dans plusieurs tissus. Elle semble donc être soumise à un contrôle différent dépendant du type cellulaire. Cependant, le gène POMC n'est présent qu'en une seule et unique copie par génome haploïde (Drouin et al. 54-58). Par conséquent, le fonctionnement du gène POMC nécessite une variété de mécanismes de régulation de la transcription pour pouvoir s'adapter aux différentes situations dans les différents sites d'expression. Plusieurs travaux ont donc été faits afin de localiser le promoteur du gène POMC, pour ensuite décrire de façon globale les séquences d'ADN nécessaires pour assurer l'expression du transcrit, mais aussi plus précisément les domaines responsables de l'histo-spécificité ainsi que les sites de liaison essentiels et les facteurs qui s'y lient.

1.3.1 Étude du promoteur

Les toutes premières études ont été réalisées par Mishina et al. à partir du gène POMC humain. Les résultats démontrent que la fusion du gène complet, comprenant 3 kb en 5' et 0.9 kb en 3' insérés dans un vecteur SV40, permet de générer un ARN similaire à celui purifié d'hypophyses humaines lorsque cette même fusion est transfectée dans un système hétérologue (cellules COS1). Par la suite, d'autres expériences en transfection transitoire ont permis de restreindre la région d'intérêt à une séquence de 745 bp, située entre les positions -680 bp à +65 bp (la position +1 correspondant au site d'initiation de la transcription), qui est suffisante pour reproduire la transcription *in vivo* du gène POMC (Mishina et al. 1533-38).

Les travaux suivants ont ensuite visé à définir les régions responsables de l'expression histo-spécifique. Ils ont été faits sur le gène de rat (rPOMC), comme la majorité des travaux sur la caractérisation du promoteur du gène POMC. Entre autre, la souris transgénique obtenue à partir de la chimère du gène rapporteur *néo* sous le contrôle du promoteur -706/+63 reproduit assez fidèlement l'expression du transgène au niveau des lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse. Cependant, une faible expression extra-hypophysaire est détectée dans les testicules de souris de quelques rares lignées (Tremblay et al. 8890-94). Afin de raffiner les séquences, une analyse de délétion à partir d'un promoteur « élargi » s'étendant de -4500 bp à +63 bp a été effectuée. Différentes délétions successives du promoteur ont été fusionnées au gène rapporteur *néo* et ces constructions ont été comparées selon leur capacité à activer la transcription du gène rapporteur dans les cellules AtT-20 (modèle de cellules corticotropes) et les cellules L (cellules fibroblastes hétérologues). Les résultats obtenus montrent que la séquence située entre -480 bp et +63 bp confère un niveau d'activation maximal et spécifique aux

cellules corticotropes. D'ailleurs, cette portion contient quelques éléments caractéristiques d'un promoteur, soit une boîte TATA parfaite en position -30 bp, ainsi que trois séquences se rapprochant fortement de la séquence consensus des boîtes CAAT entre -67 bp et -47 bp (Drouin et al. 54-58; Jeannotte et al. 4058-64). De plus, ils ont montré qu'au moins deux domaines à l'intérieur de la partie -480/+63 sont importants, soit un distal (-480/-323) et un proximal (-166/-34), puisque leur délétion réduit considérablement l'activité du promoteur (Jeannotte et al. 4058-64). Les études de transgénèse confirment que la portion -480 bp à +63 bp amène l'expression ciblée du gène rapporteur K1Tag (K1 T-antigen) dans l'hypophyse puisque les autres sites extra-hypophysaires (notamment l'hypothalamus et la peau) d'expression de la POMC ne montrent aucune trace en immunohistochimie du marqueur K1Tag (Liu et al. 3978-90). Des régions promotrices différentes situées plus en amont (entre -13 kb et -2 kb) ont aussi fait l'objet d'études et ont été décrites comme importantes pour diriger l'expression du gène POMC dans l'hypothalamus (Young et al. 6631-40).

La méthylation des îlots CpG à l'intérieur des régions promotrices a aussi été étudiée comme mécanisme d'inactivation du gène POMC puisque ce type de modification est associé à la forme condensée (non-transcrite) de la chromatine. Des travaux ont prouvé que de nombreux îlots CpG retrouvés dans le promoteur du gène POMC sont effectivement méthylés dans les tissus qui ne l'expriment pas tandis qu'ils le sont faiblement dans l'hypophyse par exemple ou dans les tumeurs qui sécrètent l'ACTH (associées au syndrome de Cushing) (Newell-Price, King, and Clark 338-48; Ye et al. 337-43). La différence de méthylation d'un tissu à l'autre représente ainsi un moyen puissant de régulation de la transcription dans le cas du gène POMC, ce qui n'est pas le

cas pour la majorité des gènes puisqu'ils sont invariablement hypométhylés dans toutes les cellules somatiques.

Par la suite, une étude exhaustive du promoteur 5' du -480 bp/+63 a été effectuée pour spécifier les principaux domaines et identifier des éléments de régulation transcriptionnelle qui s'y trouvent. La partie qui s'étend de -34 à +63 bp qui chevauche le site d'initiation de la transcription (+1) correspond au promoteur minimal. Il comprend la boîte TATA (centrée au nucléotide -27) et une partie de la séquence de l'exon 1. Il ne contribue pas à l'histo-spécificité puisque son remplacement, à l'intérieur du promoteur entier, par le promoteur minimal d'un autre gène ou des séquences équivalentes d'un vecteur RSV LTR par exemple, n'affecte en rien les sites d'expression de POMC (Jeannotte et al. 4058-64). Le reste du promoteur (-480 à -34 bp) se divise en trois parties fonctionnelles qui présentent des activités distinctes mais complémentaires. Les 132 nucléotides juste en amont du promoteur minimal (-166 à -34 bp) forment l'élément proximal (PE). Ce domaine, couplé au promoteur minimal, est suffisant pour induire une faible expression (comparativement au promoteur intact -480/+63 bp) d'un gène rapporteur dans les cellules AtT-20, mais n'est pas suffisant pour permettre l'expression adéquate dans l'hypophyse lorsqu'utilisé en transgénèse. L'élément central (CE), allant de -323 à -166 bp, a aussi été étudié de façon isolée en transfections transitoires dans le modèle de cellules corticotropes. Les résultats démontrent qu'il rehausse, de la même façon que l'élément proximal, l'activité transcriptionnelle du promoteur minimal seul lorsqu'il y est couplé. Cependant, la combinaison des éléments proximal et central n'a pas d'effet additif supplémentaire comparé à l'activité des domaines séparés. Toutefois, lorsque le CE est fusionné au transgène précédent (promoteur minimal + domaine proximal) et injecté, il induit une expression ciblée dans l'hypophyse dans 50% des

souris transgéniques. Ces résultats suggèrent donc que l'élément central contient des séquences impliquées dans la spécification des sites d'expression de la POMC (Jeannotte et al. 4058-64; Liu et al. 3978-90; Therrien and Drouin 3492-503). Finalement, l'élément distal (DE) occupe la position la plus éloignée du promoteur, soit les nucléotides -480 à -323 bp. En transfection dans les cellules AtT-20, le domaine distal isolé n'a aucune activité transcriptionnelle. Malgré tout, la délétion de cette section dans le contexte du promoteur intact (POMC -480/+63 bp) amène une forte diminution du potentiel transcriptionnel de ce dernier et qui n'est pas davantage affecté par la délétion 5' additionnelle de l'élément central. Un résultat supplémentaire de transfection montre que les parties centrale et distale jumelées au promoteur minimal ont un effet synergique qui résulte en un niveau d'activité comparable à celui du promoteur intact. Ainsi, les deux éléments compris entre -480 et -166 bp (DE et CE) constituent une unité transcriptionnelle indissociable nécessaire à la régulation et l'expression adéquate du gène POMC (Jeannotte et al. 4058-64; Therrien and Drouin 3492-503).

Finalement, l'étude plus approfondie par la méthode d'empreinte à la nucléase (DNase I footprinting) a permis d'identifier les sites de liaison à l'ADN majeurs. À l'aide d'extraits protéiques nucléaires de cellules corticotropes AtT-20 et de différentes sondes qui recouvrent la totalité des 543 bp du promoteur, Therrien et al., 1991 ont défini dix éléments régulateurs répartis entre les domaines fonctionnels. Ainsi, à l'intérieur du promoteur minimal et du domaine proximal, quatre sites sont protégés par les extraits d'AtT-20 et ont été désignés PE-1, PE-2, PE-3 et PE-4. Des six sites restants, deux sont dans le domaine central (CE-1 et CE-2) et quatre dans le domaine distal (DE-1, DE-2, DE-3 et DE-4). Un troisième site dans le domaine central (CE-3) a aussi été décrit plus tard par Lamonerie et al. (Lamonerie et al. 1284-95). La mutagenèse individuelle de

chacun de ces sites à l'intérieur du promoteur entier (-480/+63 bp) affecte dans chaque cas le potentiel transcriptionnel de la séquence intacte. Ces résultats montrent donc que le promoteur possède une multitude d'éléments régulateurs complémentaires liés par différents facteurs de transcription qui combinent leurs effets afin d'induire l'expression adéquate et histo-spécifique du peptide POMC (Figure 1.3) (Therrien and Drouin 3492-503).

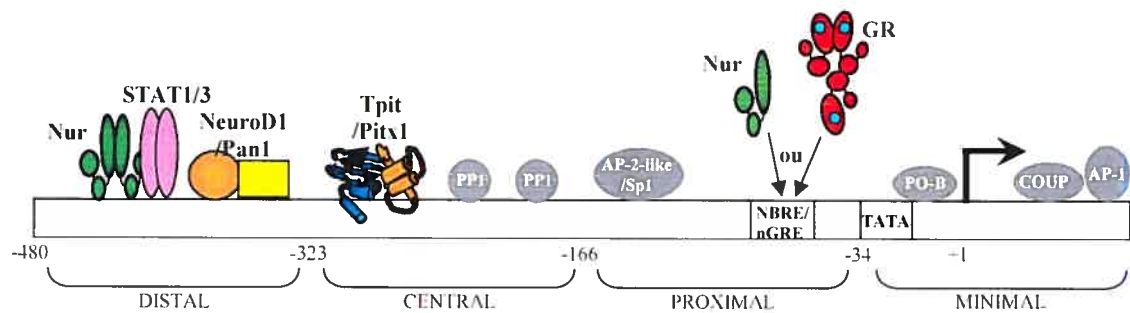


Figure 1.3 Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur du gène POMC. Différents facteurs participent à l'expression basale du gène POMC tels que les protéines AP-1, COUP, PO-B, AP-2-like, Sp1 et PP1. L'expression histo-spécifique est régulée par les facteurs Tpit, Pitx1 et NeuroD1. La régulation par les signaux extrinsèques se fait par GR, STA1/3 et les facteurs Nur.

1.3.2 Régulation histo-spécifique du gène POMC par les facteurs de transcription

Des travaux ont permis d'identifier quelques-uns des facteurs liant les différents sites décrits dans la section précédente qui sont, pour la plupart, des facteurs ubiquitaires qui ne permettent pas d'expliquer l'expression histo-spécifique du gène POMC. Cependant, ils sont importants pour la transcription basale. Parmi ceux-ci, on retrouve des facteurs comme COUP-TF, Sp1, AP-2-like, AP-1 et PO-B qui se lient principalement dans le promoteur minimal ou dans le domaine proximal, soit deux régions qui ne semblent pas impliquées dans la spécification des sites d'expression (Liu et al. 3978-90;Therrien and Drouin 3492-503;Riegel et al. 4513-21;Bishop et al. 125-29;Boutillier, Sassone-Corsi, and Loeffler 1301-10;Picon, Bertagna, and de Keyser 2627-33).

Toutefois, deux régions (-202/-193 bp et -262/-253 bp) AT-riches localisées à l'intérieur des domaines CE-1 et CE-2 ont été identifiées par la méthode d'interférence de méthylation. Ces sites sont les éléments de réponse pour une protéine nommée PPI (putative pituitary POMC1) qui n'a toujours pas été clonée mais qui est particulièrement intéressante puisqu'elle se retrouve essentiellement dans les extraits protéiques de cellules exprimant la POMC. Ce facteur pourrait donc être un important régulateur de l'histo-spécificité du gène POMC. D'ailleurs, l'analyse en transgénèse dévoile que l'expression hypophysaire est fortement diminuée par la mutation de ces sites (Liu, Mortrud, and Low 827-32). Par ailleurs, quelques autres facteurs ont été identifiés à partir de la lignée cellulaire corticotrope AtT-20. Les facteurs NeuroD1, Pitx1 et Tpit ont tous une implication dans la synergie transcriptionnelle entre les éléments central et distal du promoteur ainsi que dans le contrôle de l'expression tissulaire histo-spécifique du gène POMC.

1.3.2.1 Le facteur bHLH NeuroD1

Les efforts de caractérisation du promoteur du gène POMC ont permis d'identifier des pistes de recherche plus spécifiques afin de permettre l'identification de facteurs de première importance pour sa régulation. Un des premiers travaux effectués a consisté à découvrir lequel des trois sites DE-1, DE-2 et DE-3 du domaine distal était impliqué dans la synergie avec le domaine central, exclusive aux cellules corticotropes. Ainsi, l'élément DE-2 a été le seul à démontrer une capacité à synergiser avec le domaine central, ce qui n'était observable qu'avec l'addition d'extraits protéiques de cellules AtT-20 (et non avec des extraits de cellules GH3 ou L) (Therrien and Drouin 2342-53). Le site DE-2 a donc été un outil essentiel pour mener à la découverte d'un complexe protéique appelé CUTE (Corticotroph Upstream Transcription Element-binding) dont le facteur bHLH NeuroD1 fait partie. Puisqu'il est exprimé de façon précoce au jour e12, soit tout juste avant l'activation du gène POMC, et que son patron d'expression coïncide avec celui de la POMC dans le lobe antérieur (il est absent des cellules mélanotropes du lobe antérieur), NeuroD1 pourrait très bien être le facteur recherché. D'ailleurs, cette protéine, auparavant clonée sous le nom de BETA2 dans une sous-population de cellules de pancréas, joue aussi un rôle dans l'activation de la transcription histo-spécifique du gène de l'insuline, tandis que dans l'organisme *Xenopus laevis*, il est impliqué dans la différenciation neuronale tardive (Naya, Stellrecht, and Tsai 1009-19; Lee et al. 836-44). D'autre part, l'invalidation génique de NeuroD1 illustre l'importance de ce dernier dans la régulation de la transcription du gène POMC puisque les souris NeuroD1^{-/-} présentent un retard d'expression de la POMC dans les cellules du lobe antérieur Tpit-positives (donc lancées dans la voie corticotrope, mais non-différenciées parce qu'elles n'expriment pas l'ACTH) (Lamolet et al. 995-1003).

NeuroD1 fait partie de la famille de facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle-hélice bHLH. Comme son nom l'indique, il est composé d'une séquence d'acides aminés basiques requise pour la reconnaissance du site de liaison sur l'ADN et d'un domaine HLH conservé (deux hélices α séparées par une boucle) de 60 acides aminés qui sert d'interface de dimérisation. Effectivement, les facteurs bHLH fonctionnent en dimères dont la composition peut différer, tout dépendant des classes. La classe I de facteurs bHLH comprend les bHLH ubiquitaires qui forment des homodimères tandis que la classe II, dont NeuroD1 joint les rangs, inclut les facteurs bHLH à expression restreinte qui hétérodimérisent avec les membres de la classe I (Murre et al. 537-44; Voronova and Baltimore 4722-26).

Sur le promoteur du gène POMC, NeuroD1 se lie au site GCAGATGG, en position -377 à -370 bp dans l'élément DE-2, qui correspond à un motif appelé boîte E et dont la séquence consensus est CANNTG. Deux autres boîtes E se retrouvent à l'intérieur du CE-1 mais ne sont pas liées par NeuroD1 et ses partenaires du complexe CUTE. Seuls des facteurs ubiquitaires de classe I peuvent s'y fixer. Les expériences de transfections transitoires de Poulin et al., 1997 ont démontré que la surexpression de NeuroD1 uniquement ne réussit pas à activer la transcription de gènes rapporteurs couplés à différentes séquences contenant le DE-2. De plus, la sonde DE-2 n'est pas liée par NeuroD1 seul, confirmant que NeuroD1 fait partie de la classe II de facteurs bHLH qui ont la capacité de former des hétérodimères seulement. La surexpression simultanée de NeuroD1 et d'un facteur bHLH de classe I (Pan1/2, ITF1) restitue la capacité de liaison et de transactivation de ce premier sur son site GCAGATGG grâce à son aptitude à interagir physiquement avec l'autre bHLH et former l'hétérodimère requis (Poulin,

Turgeon, and Drouin 6673-82; Poulin et al. 4826-37). NeuroD1 agit donc en compagnie de son partenaire Pan1/2 sur le promoteur du gène POMC.

1.3.2.2 Le facteur à homéodomaine Pitx1

Une étude approfondie avait précédemment montré que le site CE-3 du domaine central était à lui seul suffisant, avec l'élément DE-2 distal, pour cibler l'activité du gène POMC dans les cellules corticotropes. Lamonerie et al. ont donc utilisé le site CE-3 comme outil afin de cribler une banque d'ADNc générée à partir de cellules AtT-20. Ces travaux ont permis d'identifier le facteur Pitx1 (pituitary homeo box 1) comme étant un activateur transcriptionnel du promoteur du gène POMC qui s'exprime très tôt (l'ARNm détecté dès e10.5) dans les tissus qui formeront ultérieurement l'hypophyse définitive (Lamonerie et al. 1284-95). D'autres fonctions ont par la suite été décrites pour ce même facteur. Grâce à ses interactions protéine-protéine avec les facteurs SF-1 et Pit-1, Pitx1 joue un rôle dans l'activation de la transcription des gènes respectifs LH β et GH/PRL, ainsi que d'autres gènes hypophysaires comme TSH β , FSH β et GnRH-R (Quirk et al. 734-46; Szeto et al. 7706-10; Bach et al. 1370-80; Tremblay and Drouin 2567-76; Tremblay, Goodyer, and Drouin 277-86; Tremblay, Lanctôt, and Drouin 428-41; Tremblay et al. 3431-41). De plus, Pitx1 est exprimé dans les membres postérieurs uniquement où il joue un rôle important dans l'établissement et le maintien de l'identité postérieure (Marcil et al. 45-55; Lanctôt, Gauthier, and Drouin 1416-22; Lanctôt et al. 1805-10).

Pitx1 est une protéine de 315 acides aminés qui fait partie de la grande classe *paired* de facteurs à homéodomaine et plus précisément de la sous-catégorie *bicoïde*, aux côtés de facteurs tels que Otx-1/2 et Goosecoïde, puisqu'elle possède un résidu lysine

caractéristique en position 9 de la troisième hélice composant l'homéodomaine. Les autres membres de sa famille sont Pitx2 et Pitx3 qui présentent une forte homologie avec Pitx1 au niveau de la séquence protéique de l'homéodomaine (95% et 93% respectivement). Pitx2 est également exprimé dans l'hypophyse, ce qui n'est pas le cas pour Pitx3. Pitx1 et Pitx2 sont tous deux importants dans les étapes initiales du développement de l'hypophyse. De plus, ils sont tous deux exprimés dans les différents types cellulaires de l'hypophyse et pourraient donc avoir des fonctions redondantes dans cette glande, ce qui permettrait d'expliquer que le phénotype ne soit pas trop sévère dans l'inactivation génique de Pitx1 ainsi que dans la souris Pitx2 hypomorphe (Szeto et al. 484-94; Suh et al. 329-37). Pitx1 est aussi important dans le développement des structures cranio-faciales et des membres inférieurs tandis que Pitx2 l'est dans l'établissement de l'asymétrie gauche/droite des organes internes de l'embryon (Yoshioka et al. 299-305). Pour sa part, Pitx3 a une expression restreinte à une sous-population de neurones dopaminergiques ainsi qu'à l'œil (van den Munckhof et al. 2535-42; Khosrowshahian et al. 577-89).

Au niveau du promoteur du gène POMC, Pitx1 agit via l'élément TAAGCC (-302/-297 bp) du site CE-3 dont la séquence se rapproche fortement du site consensus de liaison TAATCC des facteurs *bicoïdes*. Il est effectivement capable de transactiver l'élément CE-3 isolé de même que le promoteur entier du gène POMC en transfection transitoire. Des études de retard sur gel ont montré qu'il se lie en monomère sur le motif TAAGCC et que le Pitx1 présent dans des extraits nucléaires de cellules corticotropes AtT-20 ne forme qu'un seul complexe sur le CE-3, illustré par l'apparition d'une unique bande. La mutation de ce seul site empêche toute liaison et, par conséquent, toute activité transcriptionnelle de Pitx1 autant dans le contexte du CE-3 que dans celui du promoteur

complet. De plus, il serait possiblement dans une forme phosphorylée sur trois résidus lorsqu'il est lié à l'ADN, comme l'ont montré les travaux effectués par Melamed et al. sur Pitx1 qui transactive le promoteur de l'hormone LH β par sa liaison à différents sites (Melamed et al. 26200-07).

L'importance du facteur à homéodomaine Pitx1 ne se reflète pas tant dans son caractère histo-spécifique puisque comme mentionné plus tôt, il est exprimé dans divers tissus, mais plutôt dans le rôle central qu'il joue dans les interactions protéine-protéine à l'intérieur même du domaine central ainsi qu'avec les facteurs liés dans le domaine distal. Effectivement, des expériences de coimmunoprécipitation faites à partir d'extraits d'AtT-20 prouvent qu'il interagit directement avec Pan1/2, des bHLH ubiquitaires servant de partenaires transcriptionnels à NeuroD1 sur le site DE-2, ce qui assure l'effet synergique entre les domaines (Poulin et al. 4826-37). Cependant, cette interaction ne permet pas d'expliquer la capacité du site CE-3 à diriger l'expression de la POMC dans les cellules de l'hypophyse. La recherche s'est donc poursuivie afin de trouver un partenaire transcriptionnel de Pitx1 ayant, pour sa part, un patron d'expression restreint aux cellules POMC-positives présentes dans l'hypophyse et qui aurait un site de liaison à l'intérieur du domaine CE-3.

1.3.2.3 Le facteur à boîte T Tpit

L'étape suivante a donc consisté à rechercher le partenaire transcriptionnel de Pitx1 sur l'élément CE-3 du promoteur hypophysaire du gène POMC. Une série de mutations ponctuelles survolant en entier la sonde correspondant au domaine CE-3 a mené à l'identification d'un site juxtaposé à l'élément de réponse pour Pitx1 dont le motif TCACACCA rappelle fortement la séquence du demi-site de liaison du facteur

Brachyury, fondateur de la famille de facteurs de transcription à boîte T. Lamolet et al. ont poursuivi l'étude afin de détecter la présence potentielle de facteurs faisant partie de cette famille dans les cellules corticotropes AtT-20. Donc, par la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés encadrant le domaine de liaison à l'ADN (boîte T) dont la séquence conservée est bien décrite, ils sont arrivés à l'identification d'un facteur de transcription qu'ils ont nommé Tpit. Les efforts de caractérisation subséquents n'ont fait que confirmer qu'il possède toutes les qualités nécessaires pour jouer un rôle unique dans le contrôle de l'histo-spécificité et de la fonction des cellules POMC-positives de l'hypophyse. L'ARNm codant pour Tpit est détecté tôt au cours du développement au niveau de l'hypophyse uniquement. La protéine est pour sa part exprimée plus tardivement au jour e12.5 dans les cellules corticotropes du lobe antérieur et e15.5 dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire et son expression est maintenue chez l'adulte selon un patron d'expression qui colocalise avec celui de la POMC hypophysaire. De plus, la présence de quelques cellules Tpit-positives et POMC-négatives dans l'embryon au jour e13.5 démontre bien que l'expression de Tpit précède celle de POMC et suggère que Tpit est un important régulateur de la différenciation grâce à son rôle dans l'activation de la transcription du gène POMC (Lamolet et al. 849-59).

Tpit est une protéine de 446 acides aminés faisant partie de la famille de facteurs de transcription à boîte T qui comprend maintenant près d'une vingtaine de membres. Cependant, au moment de la découverte du facteur fondateur murin Brachyury, aucune protéine ne présentait de ressemblance avec ce nouveau venu, laissant croire qu'il était unique. Ce n'est qu'environ un demi-siècle plus tard qu'un gène apparenté fut cloné dans la drosophile (gène OMB), étape qui a marqué le début de nombreux travaux visant à

élargir et à caractériser la famille (Pflugfelder, Roth, and Poeck 918-25). La particularité qui définit la famille des gènes à boîte T est la présence d'une séquence d'homologie qui code pour une région d'environ 180 à 190 acides aminés qui comprend le domaine de liaison à l'ADN. La comparaison du reste de la séquence de différents gènes à boîte T ne présente aucune similarité significative, ce qui accentue l'importance de la boîte T et qui supporte l'hypothèse que ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui, par définition, doivent se lier à l'ADN pour effectuer leur fonction biologique. L'expression limitée au noyau dans la cellule donne un autre indice qu'ils sont bel et bien destinés à réguler la transcription génique. Des études supplémentaires ont conduit à l'identification d'une séquence palindromique (tête-à-tête) composée de deux demi-sites T(C/G)ACACC qui sert de site de liaison pour un dimère de Brachyury. Cependant, d'autres types de séquences peuvent également être liées par les facteurs Tbx, soit une cible tête-à-queue ou monomérique (Smith 154-58). Les facteurs à boîte T sont présents dans une grande variété d'espèces allant de l'*Homo sapiens* au ver *Caenorhabditis elegans* (Agulnik, Bollag, and Silver 214-19). La plupart sont détectés tôt au cours du développement et leur expression est maintenue chez l'organisme adulte. De plus, ils sont retrouvés dans plusieurs tissus tels que le cœur, les membres postérieurs et inférieurs, et le système nerveux (Papaioannou and Silver 9-19). Étant donné qu'ils sont exprimés de façon précoce dans l'embryon, ils sont principalement impliqués dans le développement et par conséquent, sont à la base de différentes maladies génétiques associées à des malformations congénitales (Packham and Brook R37-R44).

Sur le promoteur du gène POMC dans les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, Tpit agit en monomère sur le demi-site TCACACCA (-315/-309 bp) et interagit de façon synergique avec son partenaire obligatoire Pitx1 qui trouve son élément

de réponse 6 nucléotides en aval du site Tpit. La mutation de l'un ou l'autre des sites de liaison dans le contexte du promoteur POMC entier ou du CE-3 diminue et bloque même l'activation de la transcription par ce couple de facteurs. De plus, les résultats d'expériences de retard sur gel avec Tpit montrent qu'il est capable de lier la sonde CE-3 et qu'il forme un complexe avec Pitx1. Cette interaction protéine-protéine est très spécifique puisque le seul autre facteur à boîte T retrouvé dans les cellules AtT-20, soit Tbx1, est incapable de restituer l'activité sur le CE-3 en présence de Pitx1. Toutefois, la surexpression de Brachyury (qui a la plus forte homologie (84%) dans la boîte T avec Tpit) peut remplacer Tpit, ce qui laisse croire que l'interaction entre Pitx1 et Tpit passe par la boîte T de ce dernier (Lamolet et al. 849-59). Par ailleurs, des études de transgénèse et d'inactivation génique ont fourni beaucoup d'informations quant au rôle biologique de Tpit dans l'hypophyse. Un transgène Tpit sous le contrôle du promoteur de l' α -GSU a été produit afin d'induire l'expression de Tpit dans les cellules non-déterminées de la pointe rostrale de l'hypophyse qui expriment son partenaire Pitx1. Les résultats obtenus montrent que la surexpression anormale de Tpit entraîne l'expression ectopique de POMC ce qui montre que Tpit est impliqué dans les étapes de différenciation tardive des cellules exprimant la POMC. L'inactivation génique de Tpit entraîne la disparition de la majorité des cellules POMC-positives du lobe antérieur et du lobe intermédiaire ainsi que l'apparition ectopique de cellules gonadotropes dans ce dernier lobe. Tpit joue donc un rôle de répresseur sur le programme de différenciation gonadotrope, qui s'explique par sa capacité de trans-réprimer l'activité du récepteur nucléaire SF-1, le marqueur des cellules gonadotropes (Lamolet et al. 849-59; Pulichino et al. 738-47).

L'absence de la protéine Tpit ou la présence d'une forme non-fonctionnelle est à la base d'une maladie génétique appelé déficit congénital isolé en ACTH (IAD). Dans cette pathologie, seule l'expression de la POMC (et par conséquent de l'ACTH) dans l'hypophyse est affectée, l'ACTH dans la peau et dans le cerveau étant maintenue à un niveau normal. Le modèle murin TPIT^{-/-} a permis d'impliquer Tpit dans cette maladie puisque le phénotype se rapproche étroitement de la maladie : niveaux d'ACTH et de corticostérone sanguins très faibles, hypoplasie surrénalienne et glycémie anormalement basse induite par le jeûne. L'analyse génétique de nouveaux-nés atteints montre que l'IAD corrèle dans 73% des cas avec une mutation dans le gène TPIT. Sept mutations différentes, qui sont majoritairement des mutations ponctuelles non-sens ou faux-sens ou des délétions génomiques ont été décrites et entraînent généralement une perte de fonction de la protéine (Pulichino et al. 711-16;Vallette-Kasic et al. 943-44;Pulichino et al. 1203-07).

1.3.3 Régulation du gène POMC par les signaux extracellulaires

La transcription du gène POMC est sous l'influence de plusieurs signaux différents qui peuvent soit activer le niveau d'activité du promoteur en cas de besoin en POMC ou le réprimer afin de ramener la transcription à un niveau basal ou moindre. Ces facteurs extracellulaires sont principalement la cytokine LIF et le facteur de croissance BMP4 ou les hormones glucocorticoïdes et CRH qui seront tous décrits dans les sections qui suivent (Figure 1.4).

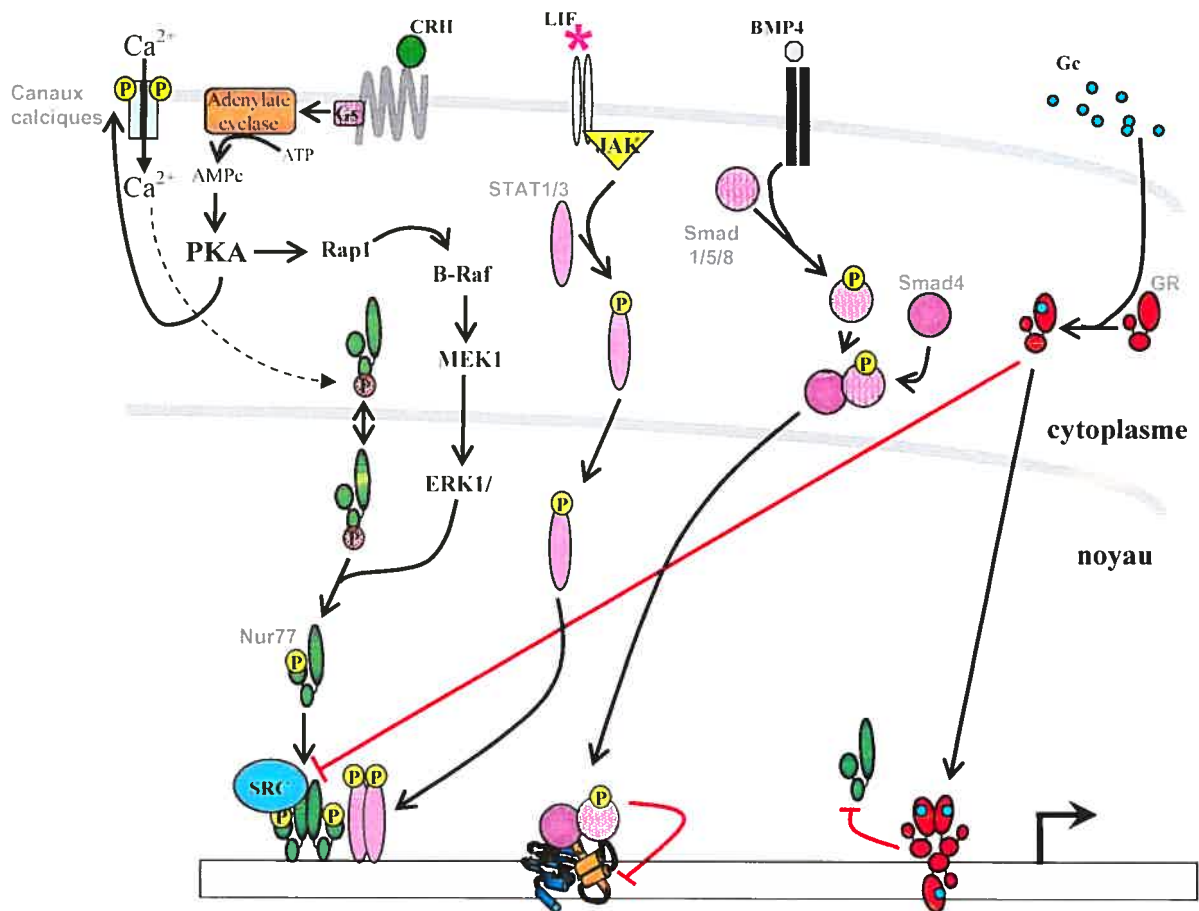


Figure 1.4 Signalisation et facteurs impliqués dans la régulation extrinsèque du promoteur du gène POMC. La CRH active les voies calcique et MAPK qui agissent sur les facteurs Nur. LIF stimule la liaison des protéines STAT1/3 sur leur élément de réponse via la voie JAK. L'activité kinase du récepteur de BMP4 sur les facteurs SMAD induit la formation d'hétérodimères qui transloquent au noyau afin d'interagir avec le couple Tpit/Pitx1 et bloquer leur activité transcriptionnelle positive. GR transloque au noyau suite à la liaison de son ligand Gc et agit faiblement en se liant directement à l'ADN dans le domaine proximal ou plus fortement en interagissant avec les facteurs Nur pour inhiber leur activité.

1.3.3.1 La cytokine LIF, les facteurs STAT et le gène POMC

Exprimé de façon précoce dans l'embryon, LIF agit d'abord comme un facteur soluble, ou morphogène, qui bloque la prolifération cellulaire et qui engage la différenciation des cellules hypophysaires dans la voie corticotrope tandis qu'il prévient l'apparition des lignées somatotrope et lactotrope. Par la suite, il stimule la sécrétion d'ACTH et agit indirectement sur le promoteur du gène POMC afin d'activer la transcription (Auernhammer and Melmed 313-45). LIF, qui peut provenir de la circulation systémique ou de la cellule corticotrope elle-même, réalise son effet en activant un récepteur, nommé LIFR, exprimé à la surface des cellules corticotropes. Ce récepteur, qui n'a pas d'activité kinase endogène, est un hétérodimère composé d'une sous-unité spécifique et d'une sous-unité cytoplasmique gp130. La liaison de LIF à son récepteur stimule l'activité d'une tyrosine kinase de la famille JAK, constitutivement associée avec gp130, qui phosphoryle les tyrosines de protéines cytoplasmiques STAT1 et STAT3. Ces facteurs forment ensuite des homo- ou hétérodimères qui peuvent transloquer au noyau et se lier à leur élément de réponse situé en position -390/-379 bp sur leur gène cible POMC et augmenter le niveau de transcription. LIF semble aussi agir sur le site -166/-96 bp dans le domaine proximal, mais le mécanisme demeure incompris puisque les études de liaison à l'ADN montrent que ni STAT1 ni STAT3 n'a d'affinité pour cette région (Ray, Ren, and Melmed 1852-59; Mynard et al. 3916-24). Il est intéressant de noter que la voie LIF peut agir en synergie avec le signal hypothalamique CRH. Le mécanisme d'activation nécessite la liaison simultanée des facteurs STAT et Nur (discutés dans la section 1.3.3.4) à leurs éléments respectifs (STAT-RE en position -390/-379 bp et NurRE) qui se chevauchent dans le domaine distal. La présence d'une

forme phosphorylée de la protéine CREB se lie ensuite au dimère pour stabiliser l'interaction et favoriser le recrutement de coactivateurs (Mynard et al. 2007-2010).

1.3.3.2 Le facteur de croissance BMP4, les facteurs Smad et le gène POMC

Le facteur BMP4 fait partie de la grande famille TGF β de peptides qui régulent une panoplie de fonctions cellulaires. Des études plus récentes ont d'ailleurs attribué à BMP4 un rôle dans les étapes initiales de la morphogenèse hypophysaire ainsi qu'un effet négatif sur la différenciation des cellules corticotropes. De plus, il agit négativement et indirectement sur le promoteur du gène POMC dans les cellules corticotropes afin d'inhiber son niveau d'expression. Pour ce faire, une cascade de signalisation est initiée par la formation d'un complexe entre le ligand BMP4 et son récepteur Alk (activin-like kinase) situé à la membrane cytoplasmique. Une fois activé, ce récepteur de type sérine/thréonine kinase recrute et phosphoryle un sous-groupe de facteurs Smad, les R-Smads, qui sont spécifiquement ciblés par le récepteur. Dans le cas d'un signal BMP, il existe trois R-Smads, soit Smad-1/5/8, qui une fois activés par phosphorylation s'associent au médiateur commun Smad-4 et transloquent au noyau où ils peuvent rejoindre leur gène-cible. Sur le promoteur du gène POMC, les facteurs Smads ne répriment pas l'activité transcriptionnelle en se liant directement à l'ADN, mais plutôt via des interactions protéiques directes avec les facteurs déjà liés à leurs éléments de réponse respectifs. Ainsi, Nudi et al. ont montré que le couple transcriptionnel Tpit/Pitx1 fixé au site CE-3 est ciblé par la cascade négative BMP/Smad. Cependant, le mécanisme d'action par lequel Smad interfère avec l'activité Tpit/Pitx1 n'est pas clair. La liaison du dimère Smad-1/Smad-4 à Tpit/Pitx1 ne semble pas affecter la capacité de liaison à l'ADN du couple puisqu'il demeure présent sur le site CE-3 après un traitement avec

BMP. Toutefois, ce résultat suggère un mécanisme dans lequel le dimère de facteurs Smad empêcherait soit le recrutement de coactivateurs par Tpit/Pitx1 ou l'interaction de ces derniers avec les facteurs bHLH du site DE-2 afin de rompre la synergie entre les domaines central et distal (Nudi, Ouimette, and Drouin 1329-42; Chen, Zhao, and Mundy 233-41; Massague, Seoane, and Wotton 2783-810).

1.3.3.3 L'hormone stéroïdienne glucocorticoïdes, GR et le gène POMC

Les glucocorticoïdes (Gc) sécrétés par les glandes surrénales jouent un rôle essentiel à l'intérieur de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien puisqu'ils complètent la boucle de rétro-inhibition nécessaire au bon contrôle du niveau de sécrétion ainsi que d'expression du gène POMC. Les glucocorticoïdes médient leur action sur la transcription en liant le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), membre de la famille de facteurs de transcription des récepteurs nucléaires. Par diffusion passive, les Gc quittent le système circulatoire pour se rendre dans le cytoplasme des cellules corticotropes où se trouve le GR dans sa forme inactive. Une fois le complexe récepteur-ligand formé, GR se trouve dans sa forme active qui peut transloquer dans le noyau et modifier le niveau d'expression de ses cibles. Sur le promoteur du gène POMC, GR agit à deux endroits principaux. Le domaine proximal comprend un site de régulation négative (nGRE, negative Gc response element) situé à -70/-56 bp sur lequel se lie un trimère de GR qui se forme par la liaison tout d'abord d'un dimère de GR et par la suite, d'un troisième GR qui se fixe sur le côté opposé de la double hélice afin de former un complexe qui entoure l'ADN. Le mécanisme de répression médié par cet élément n'est cependant pas bien compris. Certains groupes ont suggéré que la liaison du trimère de GR sur le nGRE pourrait créer un encombrement stérique qui bloquerait la liaison des facteurs

ubiquitaires ou spécifiques régulant de façon positive la transcription dans cette région du promoteur, comme par exemple les facteurs Nur. L'autre explication est que GR lié au nGRE interagirait avec les facteurs liés à l'ADN à proximité et les empêcherait de performer leur activité transcriptionnelle positive (Nakai et al. 301-06; Drouin et al. 5305-14; Drouin et al. 510-19; Drouin et al. 283-304; Drouin et al. 145-56). Cependant, la production d'un GR muté incapable de dimériser et donc de lier l'ADN, ou la délétion du site -70/-56 bp n'abolit pas l'effet répresseur des Gc sur le promoteur (Philips et al. 5952-59; Reichardt et al. 531-41).

Un autre élément nécessaire à la répression par les Gc a été identifié dans l'extrémité 5' de l'élément DE-2 (5'DE-2) du domaine distal du promoteur du gène POMC. Le 5'DE-2 isolé est sensible aux Gc et sa délétion dans le contexte du promoteur entier bloque complètement la répression par les Gc (Riegel et al. 1973-82; Philips et al. 5952-59; Martens et al. 885-97). Pourtant, il ne contient pas de séquence consensus caractéristique d'un site de liaison pour GR, mais bien un élément de réponse aux facteurs de transcription de la famille Nur (NurRE). Puisque GR ne peut lier ce site, il agit plutôt comme un antagoniste de l'activité transcriptionnelle positive des facteurs Nur en se liant directement sur ces derniers. Contrairement au mécanisme décrit sur le nGRE, l'homodimérisation de GR n'est pas nécessaire à son activité de transrépression observée sur le NurRE (Martens et al. 885-97).

1.3.3.4 L'hormone peptidique CRH et le gène POMC

La CRH est l'hormone hypothalamique qui agit tout en haut de l'axe neuroendocrinien corticotrope et qui est sécrétée lorsque l'organisme est soumis à un stress. Il a été démontré que cette hormone peptidique peut agir seule ou en synergie avec

LIF. La liaison de la CRH sur son récepteur à sept domaines transmembranaires exprimé à la surface des cellules corticotropes active la protéine Gs qui déclenche la production d'AMP cyclique (AMPc) par l'adénylate cyclase. La PKA (cAMP-dépendent protein kinase), activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (induite naturellement par la CRH) ou par son activateur synthétique forskoline, a la capacité d'augmenter non seulement la sécrétion d'ACTH, mais aussi le niveau de transcription du gène POMC puisque l'accumulation d'ARNm POMC normalement causée par un traitement CRH est bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur de PKA (PKI) (Reisine et al. 8261-65). La voie CRH/AMPc/PKA stimule deux principales cascades de signalisation pour arriver à ses fins : la voie MAPK et la voie calcique.

Pour stimuler la voie MAPK corticotrope, PKA induit la cascade d'activation séquentielle Rap1, B-Raf, MEK1 et ERK1/2, contrairement à plusieurs autres types cellulaires qui expriment seulement Raf-1 et non B-Raf et dans lesquels les voies PKA et MAPK s'antagonisent (Kovalovsky et al. 1638-51). Puisque Rap1 active spécifiquement B-Raf et inhibe Raf-1, c'est essentiellement la présence de B-Raf qui détermine la nature de l'effet d'une augmentation d'AMPc sur les MAPKs (Vossler et al. 73-82; Dugan et al. 25842-48; Qiu et al. 31921-29; Wang et al. 2130-45). Le traitement des cellules corticotropes avec un inhibiteur pharmacologique de MEK1 (PD98059) n'inhibe que partiellement l'effet stimulant de l'AMPc/PKA sur la transcription du gène POMC, ce qui montre qu'une autre voie en aval de PKA régule la synthèse de POMC en partie et la sécrétion d'ACTH.

Dans la voie calcique, PKA active les canaux calciques voltage-dépendants de type L en les phosphorylant, ce qui entraîne leur ouverture et par conséquent l'entrée de calcium extracellulaire (Ca^{2+}) dans le cytoplasme (Gerhardstein et al. 10361-70).

L'utilisation d'un inhibiteur de ces canaux, la nifédipine, bloque autant la synthèse d'ARNm POMC que la sécrétion d'ACTH induites par la CRH, ce qui démontre bien l'implication de la voie calcique dans la régulation de ces deux événements (Luini et al. 8034-38; von Dreden et al. 32-37; Lee and Tse 367-78). La cascade activée par les ions calcium est encore méconnue. Cependant, Kovalovsky et al. suggère que la CAMKII (calcium/calmodulin kinase II) pourrait avoir un rôle à jouer dans la voie calcium-dépendante (Luini et al. 8034-38; Lee and Tse 367-78; von Dreden et al. 32-37; Kovalovsky et al. 1638-51).

L'effet de la CRH sur la transcription du gène POMC est médié par plusieurs sites de liaison pour différents facteurs. Le premier élément identifié se situe entre -141 et -106 bp. La séquence à cet endroit correspond à deux sites adjacents, soit un TRE-like et un élément consensus pour les facteurs AP-2. Cependant, des études *in vitro* de liaison n'ont pas réussi à identifier les facteurs s'y liant. L'activité transcriptionnelle de ce site est rehaussée par le signal CRH, mais non par une stimulation de la PKA par la forskoline ou par la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA, ce qui suggère que les effets de la CRH pourraient passer par d'autres cascades que les voies calcique et MAPK et qu'il y a encore des mécanismes d'action du CRH qui nous échappent (Bishop and Mouradian 165-71). Par ailleurs, les éléments -171/-160 bp PCRH-RE (POMC CRH responsive element), -344/-319 bp et +41/+47 bp peuvent tous médier autant la réponse à la CRH qu'à l'AMPc/PKA. La caractérisation de ces sites de réponse est cependant très sommaire. Une protéine nommée PCRH-REB-1 lie le site -171/-160 bp et médie en partie les effets transcriptionnels synergiques entre la CRH et LIF (Jin et al. 1377-88; Bousquet, Ray, and Melmed 10551-57). Les régions -344/-319 bp et +41/+47 bp

sont liées, du moins dans des expériences *in vitro*, par les facteurs CREB et AP-1 respectivement (Boutillier et al. 745-55; Kraus and Holtt 103-10; Boutillier et al. 33-43).

Sur le promoteur du gène POMC, le médiateur de la réponse à la CRH le mieux caractérisé fait partie de la famille Nur de récepteurs nucléaires orphelins (aucun ligand ne leur a été attribué jusqu'à maintenant) qui comportent trois membres : Nur77, Nurr1 et NOR-1. Ces facteurs de transcription peuvent lier, de façon ligand-indépendante, l'élément de réponse NBRE (-70/-63 bp) dont la séquence AAAGGTCA chevauche le site nGRE décrit plus tôt et lie des monomères de facteurs Nur. Bien que ce site soit stimulé par un traitement à la forskoline ou une surexpression des facteurs Nur, la délétion ou la mutation de ce site ne diminue que très peu l'effet de la forskoline sur le promoteur entier. Ce résultat a poussé plus loin l'étude du promoteur et a permis d'identifier une nouvelle cible des facteurs Nur qui répond très fortement à la signalisation CRH. Situé dans le domaine distal en position -404/-383 bp, le NurRE est un palindrome, dont les deux demi-sites sont disposés en queue à queue, qui lie préférentiellement des homo- ou hétérodimères de Nur77. Ce site répond très fortement à un traitement CRH ou forskoline, et une mutation dans un des demi-sites, dans le contexte du NurRE isolé, abolit complètement son potentiel transcriptionnel en réponse au signal hypothalamique (Philips et al. 5946-51; Maira et al. 7549-57). Le mécanisme impliqué dans cet effet de la CRH requiert l'activation des deux voies de signalisation discutées plus haut, mais les effets spécifiques de chacune d'elles n'ont pas été départagés. Maira et al. ont montré que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle sur le NurRE causée par la voie CRH/AMPC/PKA n'est pas due à une augmentation du niveau de facteurs Nur, mais plutôt à une série de modifications post-traductionnelles sur les protéines pré-existantes. En effet, sans stimulation, les facteurs Nur sont maintenus

inactifs dans le cytoplasme. L'activation de la voie CRH/AMPC/PKA induit la translocation des Nur dans le noyau ainsi qu'une déphosphorylation de la sérine 316 dans le domaine de liaison à l'ADN qui permet et augmente l'affinité de liaison des dimères à l'ADN. L'action de PKA permet également le recrutement de coactivateurs de la famille SRC/p160, via leur domaine riche en glutamine, sur le domaine amino-terminal (AF-1) des protéines Nur. Une hyperphosphorylation du domaine AF-1 n'a pas été prouvée mais pourrait expliquer cette augmentation d'interaction protéine-protéine étant donné qu'un même phénomène a déjà été décrit pour d'autres récepteurs nucléaires comme SF-1 et ER β (Maira et al. 763-76;Mynard et al. 2997-3010;Hammer et al. 521-26;Tremblay et al. 513-19).

1.3.3.4.1 Les coactivateurs de la famille SRC/p160

La famille SRC/p160 de coactivateurs compte trois membres : SRC-1/NCoA-1, SRC-2/NCoA-2/TIF2/GRIP-1 et SRC-3/NCoA-3/TRAM-1/ACTR/pCIP/RAC3/AIB-1. Par définition, les coactivateurs sont des protéines qui peuvent interagir avec des facteurs liés à l'ADN afin d'augmenter leur activité transcriptionnelle. Pour performer dans cette fonction, les coactivateurs SRC sont composés de multiples domaines communs entre les membres de la famille, ce qui explique pourquoi un membre peut partiellement compenser pour la perte de fonction d'un autre (Leo and Chen 1;Xu and O'Malley 185-92;Xu and Li 1681-92). Ils possèdent tous un domaine bHLH-PAS dans la partie amino-terminale pour lequel un rôle d'interface d'interaction intra- ou intermoléculaire a été suggéré mais jamais confirmé. Au centre de la protéine se retrouve un domaine RID qui consiste en trois motifs conservés LXXLL responsables de l'interaction avec les récepteurs nucléaires ligand-dépendants. Enfin, la partie carboxy-terminale confère une

activité enzymatique histone acétylase (HAT) intrinsèque en plus de contenir un domaine d'activation transcriptionnelle ainsi qu'un domaine riche en glutamine et des domaines d'interaction avec les facteurs CARM-1 (Co-activator-associated arginine methyltransferase-1) et CBP/p300 (couplé à son partenaire p/CAF) qui possèdent aussi une activité HAT. L'activité HAT intrinsèque n'a toutefois été décrite que pour SRC-1 et SRC-3 (Chen et al. 569-80; Spencer et al. 194-98). La fonction principale des coactivateurs SRC est donc d'acétyler la chromatine dans les régions promotrices, ou du moins d'amener avec eux au promoteur des protéines ayant une activité HAT, afin de permettre la transcription. Parmi les autres molécules qu'ils peuvent recruter, on compte CARM-1, RIP140, ASC-2, SRA (Steroid receptor RNA activator), PGC-1 (PPAR- γ coactivator 1) ou BAF57 du complexe SWI/SNF, qui sont entre autre impliquées dans le remodelage de la chromatine ou dans des interactions avec la machinerie transcriptionnelle de base. Pour être attirés et maintenus au promoteur, les SRC interagissent physiquement avec les facteurs qui y sont déjà liés. De plus, des modifications post-traductionnelles dans leurs différents domaines sont parfois nécessaires pour assurer leur bon fonctionnement. En effet, différents exemples décrits dans la littérature montrent que SRC-2 et SRC-1 doivent être phosphorylés pour effectuer convenablement leur fonction de coactivation pour les récepteurs nucléaires AR et PR respectivement tandis que l'activité transcriptionnelle de ER α peut être rehaussée par la forme non-phosphorylée de SRC-1 (Frigo et al.; Gregory et al. 7119-30; Rowan et al. 8720-30; Coleman et al. 12834-45). La plupart des travaux qui portent sur les coactivateurs SRC/p160 caractérisent des interactions avec AR, ER, GR ou PR puisqu'ils ont d'abord été clonés comme cofacteurs pour des récepteurs nucléaires, mais ils peuvent aussi interagir avec des facteurs de différentes classes. Par exemple, SRC-1 peut

augmenter l'activité transcriptionnelle des facteurs NF- κ B, Smad-3, STAT3 et AP-1 tandis que SRC-2 agit sur c-jun, myogenin et MEF2c et SRC-3 coactive interféron- α et CREB (Lee et al. 16651-54; Yanagisawa et al. 1317-21; Na et al. 10831-34; Torchia et al. 677-84; Zhao et al. 541-48; Chen et al. 4324-33; Chen et al. 1209-28). Ces multiples interactions montrent que les coactivateurs SRC peuvent être impliqués dans une panoplie de voies de signalisation.

1.4 Objectifs de travail

À mon arrivée au laboratoire, le rôle des facteurs de transcription de la famille Nur sur le promoteur du gène POMC et les mécanismes moléculaires impliqués dans leur fonctionnement en réponse à la stimulation hormonale CRH étaient bien décrits. Nur77 était le plus important médiateur des effets de la CRH connu jusqu'à ce jour. Cependant, les membres du laboratoire ont échoué lorsqu'ils ont tenté de prouver que l'élément de réponse NurRE était essentiel à cette réponse hormonale. En effet, l'analyse plus approfondie de mutants de délétion du promoteur a permis de démontrer que non seulement l'ablation du site NurRE dans le contexte du promoteur entier n'abolit pas le potentiel transcriptionnel du promoteur mais également que l'activité transcriptionnelle du domaine central, et plus précisément l'élément CE-3 (ou Tpit/Pitx1-RE), est fortement rehaussée par la voie CRH/AMPC/PKA/MAPK. Par ailleurs, les deux demi-sites (Tpit-RE ou Pitx1-RE) sont requis pour médier l'effet de la CRH, puisque la mutation de l'un ou l'autre des demi-sites abolit non seulement l'effet activateur de la CRH, mais aussi l'activité basale de l'élément. Ces données confirment donc l'interdépendance entre Tpit et Pitx1 lors de la régulation du gène POMC. De plus, les résultats montrent qu'un

traitement à l'inhibiteur de MEK1 (PD98059) bloque complètement l'effet activateur de cette stimulation hormonale, suggérant que l'effet de la CRH passe essentiellement par la voie PKA/MAPK et non par la voie calcique (Annexe 1 et 2). Ces données ont donné naissance à un projet ayant pour but de définir les mécanismes moléculaires par lesquels la cascade de signalisation initiée par la CRH affecte l'activité transcriptionnelle des facteurs liés à l'élément Tpit/Pitx1. Mon premier objectif était donc de spécifier la cible de la voie PKA/MAPK sur l'élément CE-3. Le deuxième objectif était de déceler, parmi plusieurs mécanismes possibles, celui qui permettrait d'expliquer le rehaussement de l'activité transcriptionnelle du facteur ciblé. Finalement, le dernier objectif consistait à déterminer l'effet de la voie de signalisation AMPc/PKA/MAPK.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Plasmides

Le plasmide rapporteur Tpit/Pitx1-RE₃ (aussi appelé CE3) est formé d'une série de trois copies de l'élément CE3 fusionnée au promoteur minimal POMC de rat (-34 à +63 bp), le tout inséré dans le vecteur pXP1 (Lamolet *et al.*, 2001). Le plasmide rapporteur NurRE₃ consiste aussi en trois copies du NurRE insérées dans le vecteur pXP1 (Philips *et al.*, 1997a). Les vecteurs d'expression RSV-vide, RSV-Tpit, RSV-Flag-Tpit, RSV-PKA, RSV-Pitx1, RSV-Myc-Pitx1, pCMX et CMV-Nur77 ont été décrits ailleurs (Lamonerie *et al.*, 1996; Lamolet *et al.*, 2001; Maira *et al.*, 2003b). Les mutants de délétion de Tpit ont été générés par PCR et insérés dans le même vecteur que le Tpit sauvage (Lamolet *et al.*, 2001). Les vecteurs d'expression de SRC-1, SRC-2 et SRC-3 sont décrits dans la référence (Maira *et al.*, 2003b). Le mutant SRC-2(S736A) est décrit dans la référence (Benecke *et al.*, 2000) et a été généré selon le protocole de Stratagene par mutagenèse dirigée à partir du vecteur CMV-SRC-2_{humain} et les oligonucléotides sens 5'-TTAAACAAGAGCCGGTGGCCCCCAA GAAGAAAGAGAATG-3' et antisens 5'-CATTCTCTTTCTTCTTGGGGGCCAC CGGCTCTTGTTTAA-3'. Le mutant SRC-1(7A) ainsi que le vecteur pCR3.1 sont décrits dans le papier (Rowan *et al.*, 2000b) et proviennent du laboratoire du Dr. Nancy Weigel. Le vecteur pSP64 provient de chez Promega.

2.2 Culture cellulaire et transfections

Les différents types cellulaires utilisés (AtT-20, 293T, CV-1) sont maintenus en culture à 37°C avec 5% CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 100 µg/mL de pénicilline/streptomycine. Cependant, les AtT-20 peuvent être, à certaines exceptions, soumises à différentes conditions telles que mentionnées dans les légendes de figures.

Pour les expériences de transfections transitoires, des cellules CV-1 (fibroblastes provenant de rein de singe) sont utilisées. Elles sont préalablement ensemencées à ~75 000 cellules par puits, dans des plaques de 12 puits. 24 heures plus tard, elles sont transfectées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Brièvement, chaque échantillon d'ADN (pour un puits) comprend 1 µg de plasmide rapporteur, 250 ng de RSV-Tpit (ou ses mutants), 250 ng de RSV-Pitx1, 100 ng de RSV-PKA ou la quantité manquante de RSV-vide pour maintenir une quantité égale de vecteur RSV dans chacun des puits, 250 ng de CMV-SRC-2 (ou SRC-1 ou SRC-3 ou les mutants) ou la quantité manquante de CMV-vide pour maintenir une quantité égale de vecteur CMV dans chacun des puits et finalement 12,5 ng de CMV-βgal comme contrôle interne et du vecteur pSP64 jusqu'à un total de 3 µg par puits. Les milieux de culture sont changés 24 heures plus tard et les cellules sont récoltées 48 heures après la transfection dans 200 µL de tampon de lyse adapté pour l'essai luciférase (100 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5% NP-40 et 1 mM DTT). L'essai luciférase est pratiqué dans un luminomètre Berthold LB953 à partir de 100 µL de ce lysat et une solution luciférine (500 mM Tris-HCl pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM ATP, 0,1 mM CoA, 1 mM luciférine) tandis que la mesure d'activité β-galactosidase est faite avec 50 µL de lysat et le kit Galacto-Star (Applied Biosystems). Les résultats représentent la moyenne de 3 à 7 expériences, faites en duplicata, +/- l'erreur standard sur la moyenne.

Pour les expériences de quantification du niveau d'expression ou pour l'isofocalisation en deux dimensions, les cellules AtT-20 sont utilisées. Elles sont

préalablement ensemencées à 4×10^6 cellules par pétri de 100 mm. 48 heures plus tard, les cellules sont plac  es en conditions faibles en sérum dans un milieu de culture DMEM 0,2% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% pénicilline/streptomycine. Après 24 heures, les cellules sont soumises aux différents traitements spécifiés dans les légendes des figures et r  colt  es pour faire les extraits cellulaires nécessaires.

Pour les surexpressions utilis  es dans les expériences de retard sur gel, les cellules 293T (fibroblastes provenant de rein de singe) sont utilis  es. Elles sont ensemenc  es à $1,5 \times 10^6$ cellules par pétri de 100 mm et sont transfect  es 24 heures plus tard par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Chaque échantillon d'ADN (pour un pétri) comprend 2 μ g de RSV-myc-Pitx1 ou de RSV-Flag-Tpit ou de vecteur RSV-vide, et 2 μ g de RSV-PKA ou de vecteur RSV-vide pour une quantité totale de 4 μ g d'ADN par pétri.

2.3 Préparation des extraits cellulaires

2.3.1 Extraits nucléaires

Les pétris 100 mm de cellules AtT-20 sont rincés trois fois au PBS, r  colt  es dans 1 mL de PBS/ 1mM EDTA et centrifug  es 30 secondes à 14 000 rpm. Les culots sont resuspendus dans 800 μ L de buffer A (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,01 μ g/ μ L aprotinine, 0,01 μ g/ μ L leupeptine, 0,01 μ g/ μ L pepstatine) et gardés sur glace pendant 15 minutes avec inversions périodiques. Ensuite, 0,5% NP-40 sont rajoutés au buffer A. La suspension est vortex  e vigoureusement pendant 10 secondes et centrifug  e 30 secondes à 14 000 rpm. Les culots de noyaux sont resuspendus dans 100 μ L de buffer C (20 mM Hepes pH 7,9, 400mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,01 μ g/ μ L

aprotinine, 0,01 µg/µL leupeptine, 0,01 µg/µL pepstatine), agités pendant 30 minutes à 14 000 rpm à 4°C, centrifugés 5 minutes à 4°C. Les surnageants sont conservés et la teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

2.3.2 Extraits totaux pour retard sur gel

Les pétris 100 mm de cellules 293T sont rincés trois fois au PBS, récoltées dans 1 mL de PBS/ 1mM EDTA et centrifugées 30 secondes à 14 000 rpm. Les culots sont resuspendus dans 500 µL de buffer WCE (20 mM Hepes, 400 mM KCl, 20% glycérol, 0,5 mM PMSF, 2 mM DTT, 0,01 µg/µL aprotinine, 0,01 µg/µL leupeptine, 0,01 µg/µL pepstatine), laissés sur glace sèche pendant 5 minutes et sur glace pendant 5 minutes supplémentaires et centrifugés pendant 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Les surnageants sont conservés et dosés par la méthode de Bradford.

2.3.3 Extraits totaux pour isofocalisation en deux dimensions (Gel 2D)

Les pétris 100 mm de cellules AtT-20 sont rincés trois fois au PBS et les cellules sont lysées directement dans les pétris avec 500 µL de tampon d'extrait total (8 M urée, 4% CHAPS). Les culots visqueux sont récoltés, liquéfiés à l'aide de seringues et d'aiguilles (18G1½, 23G1) et centrifugés pendant 25 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Les surnageants sont gardés et dosés par la méthode de Bradford.

2.4 Retard sur gel (Gel Shift)

La sonde double-brin correspondant au demi-site Pitx1 est préparée par hybridation à partir des olingonucléotides 5'-TGGACAGAGGCTTAGCAT-3' et 5'-

CAGGATGCTAAGC CTCTGTCCA-3' et la sonde palindromique Brachyury à partir de l'oligonucléotide 5'-GATCCAATTTACACCTAGGTGTGAAATT-3'. Les deux sondes ont été marquées radioactivement par la Klenow. Les réactions de liaison sont réalisées pendant 1 heure à 4°C dans le tampon de liaison (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,05% NP-40, 6% glycérol, 1 mM DTT) comprenant 5 µg d'extrait protéique total (section 2.3.2), 500 ng de poly(dI-dC), 100 ng de sonde simple-brin non-spécifique et 50 000 cpm de sonde pour un volume total de 20 µL. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 5% dans le tampon de migration (40 mM Tris, 195 mM glycine) à 200 V pendant 3 heures à 4°C. Le gel est séché et ensuite révélé par autoradiographie.

2.5 Immunobuvardage (Western blot)

Les échantillons sont préparés à partir de 50 µg d'extraits nucléaires (figure 3.1) ou 100 µg d'extraits totaux pour gel 2D (figure 3.6) qui sont préalablement dénaturés par ébullition dans le tampon laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol, 100 mM DTT). Ils sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% dans le tampon de migration (25 mM Tris, 250 mM glycine, 1% SDS) à 160 V pendant 1 heure. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Immobilon (millipore) dans le tampon d'électro-transfert (25 mM Tris, 250 mM glycine, 20%(vol/vol) méthanol) à 100 V pendant 2 heures. Les membranes sont mises à bloquer (PBS, 5% lait, 0,1% Tween-20) pendant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont dilués à 1:2000 (anti-Tpit), 1:1000 (anti-Myc 9E10 #sc-40, Santa Cruz), 1:1000 (anti-Flag M2 #F3165, Sigma), 1:150 (anti-p44/42 MAP kinase #9102, Cell Signaling), 1:150 (anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) #4376, Cell Signaling)

dans la solution de blocage. Les membranes sont incubées pendant 1 heure et demie avec les anticorps primaires, lavées 3 fois 5 minutes avec du TBS (0,1% Tween-20) et incubées avec l'anticorps secondaire 1:20 000 (anti-lapin IgG-HRP #A6154, Sigma ou anti-souris #A4416, Sigma) pendant 1 heure. Après une autre série de lavages, les membranes sont révélées avec le kit ECL+ (Amersham) ou Visualizer (Upstate) dans le cas des immunobuvardages sur gel 2D.

2.6 Essai d'interaction protéique *in vitro* (Pull-down assay)

Les protéines radioactives sont produites avec le kit de traduction *in vitro* « TNT coupled reticulocyte lysate system » (Promega). Les protéines de fusion MBP purifiées sur résine sont produites selon la procédure décrite dans (Batsche et al., 1998). Une pré-incubation est réalisée pendant 1 heure à 4°C avec rotation dans un volume total de 195 µL de tampon d'interaction (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 2% BSA) contenant 500 ng de protéine de fusion. Pour la liaison, 5 µL de protéines [35S-Met] issues de la réaction de marquage sont ajoutés et le tout est incubé pendant 2 heures à 4°C avec rotation. Les réactions sont lavées 2 fois avec le tampon 1 (250 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5 mM EDTA), 2 autres fois avec le tampon 2 (125 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5 mM EDTA) et ensuite dénaturées dans le tampon laemmli. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le gel est coloré au bleu de coomassie pour confirmer que la quantité de protéine de fusion est équivalente dans toutes les réactions et finalement séché pour être autoradiographié.

2.7 Isofocalisation bi-dimensionnelle (Gel 2D)

Les extraits totaux sont faits selon le protocole décrit dans la section 2.3.3. Les étapes de l'isofocalisation sont décrites dans le protocole d'Amersham. Brièvement, 150 µg d'extraits totaux pour chaque condition expérimentale sont dilués dans le tampon de réhydratation (8 M urée, 0,5%(w/v) CHAPS, 0.2%(w/v) DTT, 2%(v/v) IPG buffer pH 3-10, 0,002% bleu de bromophénol) pour obtenir un volume total de 200 µL. Les échantillons sont déposés dans les sarcophages de réhydratation, les bandes IPG (Immobiline DryStrip, 11 cm, pH 3-10, Amersham) sont placées sur les échantillons et recouvertes d'huile. Les sarcophages sont déposés dans le système d'isofocalisation Ettan IPGphor qui est mis en marche pour la réhydratation et la migration. Les bandes sont ensuite équilibrées dans le tampon d'équilibration (4% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urée, 30%(v/v) glycérol, 0.002% bleu de bromophénol, 1% DTT ou 2,5% IAA) et placées sur gel de polyacrylamide 10% pour l'étape de séparation selon le poids moléculaire. Les gels sont ensuite transférés sur membrane Immobilon (section 2.5) et analysés par immunobuvardage. Une partie du gel peut aussi être analysée par une coloration au nitrate d'argent pour confirmer que la migration s'est faite de façon similaire sur chaque bande IPG.

2.8 Essai kinase *in vitro*

Les protéines de fusion MBP (2 µg/réaction) sont diluées dans un volume total de 25 µL contenant 5 µL de tampon de réaction 5x (125 mM Tris-HCl pH 5,7, 0,1 mM EGTA), 10 µCi dilué dans le cocktail Magnésium/ATP (75mM MgCl₂ et 500µM ATP in 20mM MOPS, pH 7,2, 25mM β-glycérol phosphate, 5mM EGTA, 1mM sodium

orthovanadate, 1mM DTT) et 2, 10 ou 20 ng de ERK1 recombinante (Upstate, #14-439) diluée dans le tampon de dilution (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1mM EGTA, 0,1mM sodium orthovanadate, 0,1% β -mercaptoéthanol, 1mg/ml BSA). La kinase est activée à 30 °C pendant 20 minutes et la réaction est arrêtée avec l'ajout de laemmli. Les échantillons sont dénaturés, séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et analysés par autoradiographie.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1 Tpit est un médiateur de l'action de la CRH sur le promoteur du gène POMC

Les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire montrent que l'activité transcriptionnelle de l'élément CE-3 (ou Tpit/Pitx1-RE) isolé est fortement rehaussée par la CRH ou la forskoline (stimulant pour l'activité de l'adénylate cyclase) ou une surexpression de la sous-unité catalytique de PKA. Cependant, ces données ne procurent aucune information permettant de conclure quel est le facteur ciblé par la voie CRH/AMPC/PKA. Pour répondre à cette question, le plasmide rapporteur Tpit/Pitx1-RE₃ a été co-transfecté dans les cellules hétérologues CV-1 avec des vecteurs d'expression codants pour Tpit et/ou la sous-unité catalytique de PKA (PKAc) pour simuler la stimulation CRH étant donné que ces cellules n'expriment pas le récepteur CRHR1. La même expérience a été répétée en remplaçant le vecteur d'expression Tpit par Pitx1. J'ai utilisé un type cellulaire autre que le modèle de cellule corticotrope AtT-20 car il aurait été impossible de distinguer entre l'effet d'une surexpression de PKA sur l'activité de Tpit de celui sur Pitx1 puisqu'ils sont tous deux exprimés dans les AtT-20. Les résultats montrent que l'activité transcriptionnelle basale assez faible de Tpit est fortement rehaussée par la surexpression de PKAc, tandis que l'effet n'est pas aussi marqué sur le facteur Pitx1 (Figure 3.1A). Tpit est donc la principale cible de la cascade de signalisation CRH/AMPC/PKA sur l'élément CE-3. Le faible effet de PKAc sur Pitx1 s'explique par une augmentation d'affinité de liaison de Pitx1 à l'ADN observée dans une expérience de retard sur gel (Figure 3.1B). Cependant, dans le cas de Tpit, ni le retard sur gel, ni l'analyse des niveaux de protéine Tpit dans les différentes conditions ne

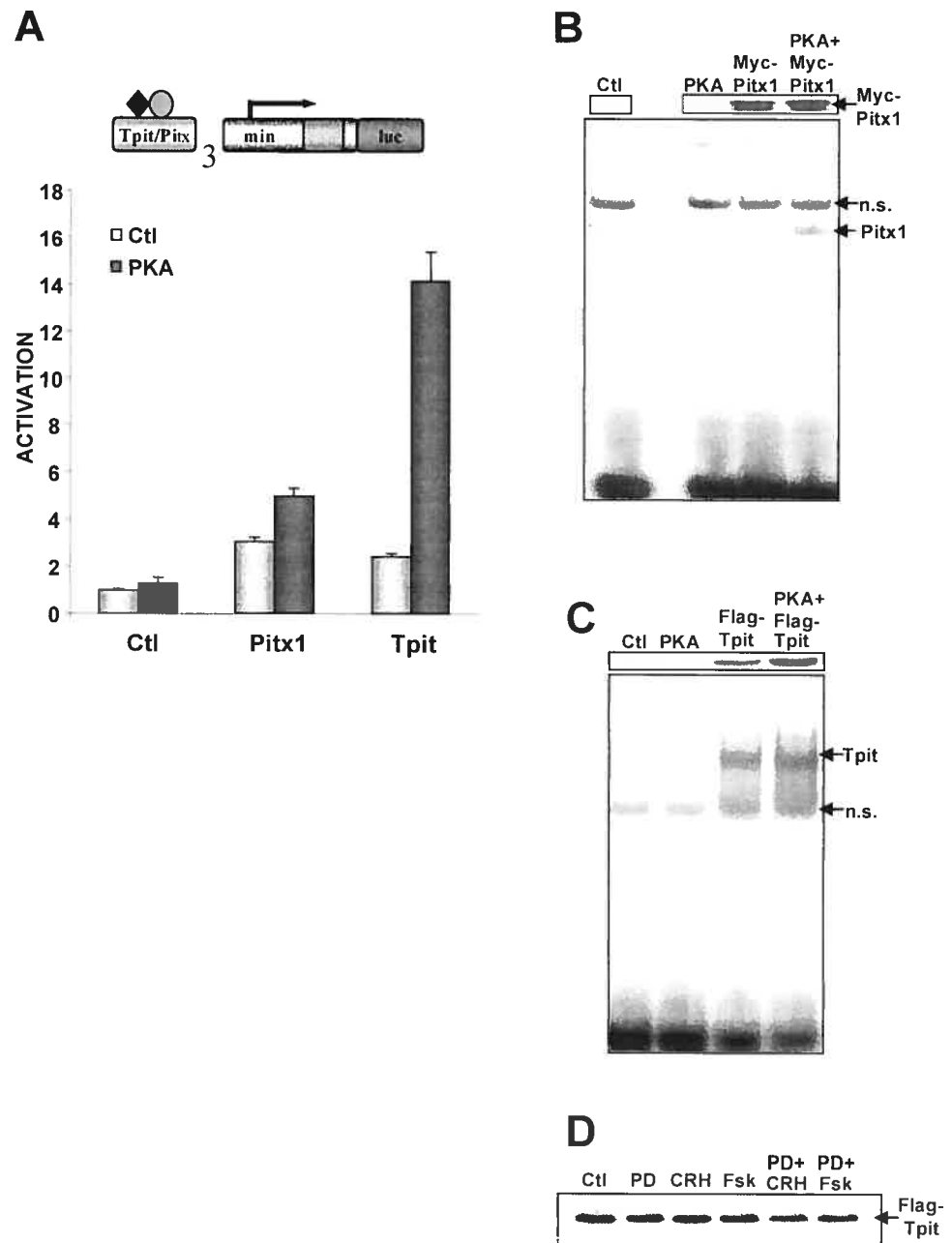


Figure 3.1 Tpit est un médiateur de l'action de la CRH sur le promoteur du gène POMC. La voie PKA activée par la CRH augmente l'activité transcriptionnelle de Tpit en transfection transitoire (A) sans affecter son affinité de liaison à l'ADN en étude *in vitro* de retard sur gel (C) ou son niveau d'expression détecté par immunobuvardage dans les cellules AtT-20 (D) (CRH 10^{-7} M, Fsk 10^{-5} M et PD 98059 (PD) 50 μ M). Le faible effet de PKA sur Pitx1 (A) s'explique par l'augmentation de l'affinité de liaison à l'ADN (B).

peuvent expliquer les mécanismes moléculaires responsables de l'effet de PKAc puisque son affinité de liaison à l'ADN n'est pas modifiée et que son niveau d'expression est maintenu constant autant dans les cellules CV-1 suite à une surexpression de PKAc (Figure 3.1C) que dans les cellules AtT-20 après une stimulation avec la CRH (Figure 3.1D).

3.2 Action des coactivateurs transcriptionnels

Afin d'identifier le mécanisme responsable de l'augmentation du potentiel transcriptionnel de Tpit par PKAc, nous nous sommes inspirés du modèle décrit pour les facteurs de transcription de la famille Nur. Dans l'article (Maira et al., 2003), les auteurs démontrent que des coactivateurs de la famille SRC/p160 sont recrutés par les dimères de facteurs Nur sur le site NurRE et que ce recrutement est augmenté par une stimulation CRH. Par conséquent, l'hypothèse d'un effet possible des coactivateurs SRC/p160 sur l'activité transcriptionnelle de Tpit a été testée en transfection transitoire dans les cellules CV-1 par la co-transfection du plasmide rapporteur Tpit/Pitx1-RE₃, ainsi que des vecteurs d'expression Tpit et/ou SRC-2. La surexpression de Tpit uniquement n'accroît que faiblement l'expression du gène rapporteur. Cependant, la surexpression combinée de Tpit et SRC-2 rehausse de tout près de 3 fois l'activité transcriptionnelle sur le Tpit/Pitx1-RE, effet qui ne se reproduit pas lorsque la même expérience est répétée pour le facteur Pitx1 (Figure 3.2A). Ce résultat suggère donc que l'effet du coactivateur SRC-2 sur l'élément CE-3 est spécifique à Tpit. Chaque membre de la famille SRC/p160 partage cette capacité de rehausser l'activité de Tpit qui n'est pas attribuable à un effet

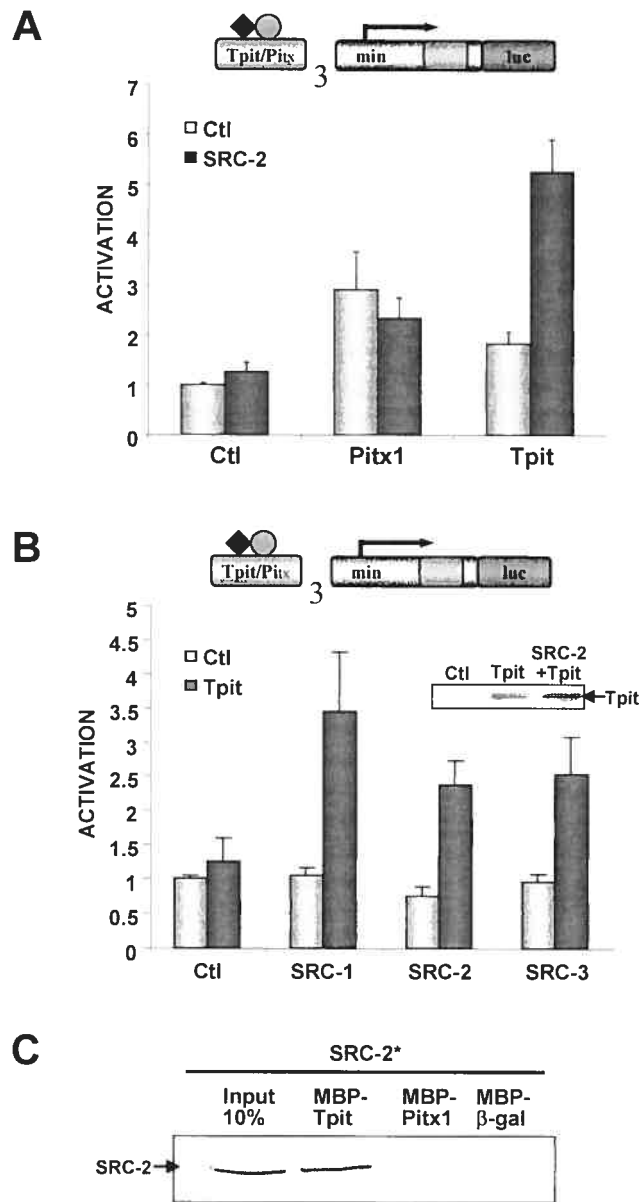


Figure 3.2 Action des coactivateurs transcriptionnels. La co-transfection des coactivateurs SRC/p160 rehausse l'activité de Tpit (A) tandis qu'elle n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle de Pitx1 (B). Ce résultat corrèle avec le résultat d'essai d'interaction *in vitro* qui montre que seul Tpit mais non Pitx1 peut interagir avec le coactivateur SRC-2 (C).

indirect sur les niveaux d'expression de Tpit (Figure 3.2B et encadré). Par ailleurs, puisque les coactivateurs agissent par définition via des interactions protéiques, la capacité d'interaction de SRC-2 avec les protéines de fusion MBP-Tpit et MBP-Pitx1 a été comparée en essai d'interaction protéique *in vitro*. La spécificité d'interaction des coactivateurs SRC/p160 sur Tpit essentiellement corrèle avec le fait que SRC-2 interagit physiquement uniquement avec Tpit et non avec Pitx1 (Figure 3.2C).

3.3 Synergie entre les signaux d'activation et le recrutement de coactivateurs sur Tpit

Les résultats précédents démontrent que la voie CRH/AMPC/PKA et les coactivateurs de la famille SRC/p160 possèdent tous deux la capacité de rehausser le niveau d'activité transcriptionnelle de Tpit sur l'élément de réponse Tpit/Pitx1-RE, ce qui laisse croire que ces deux intermédiaires pourraient faire partie d'une seule et même cascade de signalisation. Pour vérifier cet énoncé, j'ai co-transfecté dans les cellules CV-1 la sous-unité PKAc et le coactivateur SRC-2 afin d'étudier l'effet de leur combinaison sur l'activité transcriptionnelle de Tpit et Pitx1 sur le plasmide rapporteur Tpit/Pitx1-RE₃ (Figure 3.3). Dans le cas de Pitx1, utilisé comme contrôle pour confirmer la spécificité du mécanisme, l'activation causée par la surexpression combinée de PKAc + SRC-2 est égale à celle induite par PKAc seulement. Cette donnée confirme que le potentiel transcriptionnel de Pitx1 n'est que faiblement augmenté par la PKA seule et que la surexpression de PKAc + SRC-2 n'a pas d'effet additionnel. Dans aucun des cas, SRC-2 ne module l'activité de Pitx1. La situation est totalement différente pour Tpit puisque la surexpression PKAc + SRC-2 rehausse l'activité de ce dernier d'environ 45 fois, soit plus que la somme des activations individuelles par PKAc (5 fois) et SRC-2 (15 fois). La

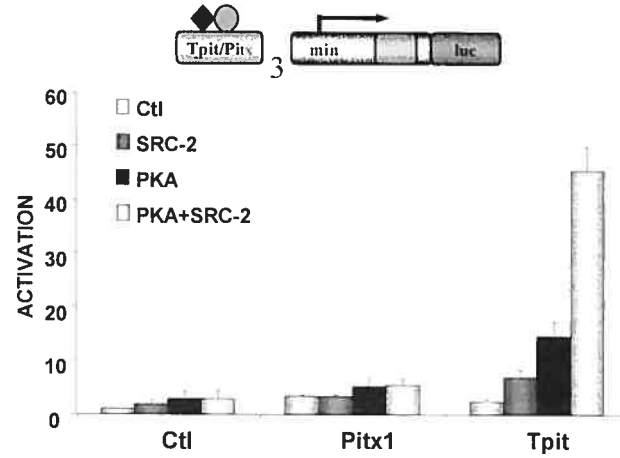


Figure 3.3 Synergie entre les signaux d'activation et le recrutement de coactivateurs sur Tpit. La co-transfection de PKA rehausse fortement l'effet du coactivateur SRC-2 sur l'activité de Tpit sur l'élément de réponse Tpit/Pitx1-RE.

synergie entre PKAc et SRC-2 impliquée dans la régulation de l'activité de Tpit permet d'affirmer qu'ils sont tous deux impliqués dans différentes étapes d'une même voie de signalisation intracellulaire.

3.4 Domaine(s) protéique(s) d'importance pour le rehaussement de l'activité transcriptionnelle de Tpit par PKA + SRC-2

Selon les résultats précédents, l'interaction physique directe entre le facteur de transcription Tpit et le coactivateur SRC-2 est nécessaire pour que ce dernier puisse effectuer sa fonction de régulateur positif. C'est d'ailleurs cette interaction protéique de SRC-2 avec Tpit (et non pas avec Pitx1) qui procure de la spécificité au mécanisme (Figure 3.2A et C). Étant donné l'importance de cette interaction, j'ai décidé de la caractériser davantage en définissant les domaines nécessaires dans chacune des protéines impliquées (Tpit et SRC-2) pour obtenir la potentialisation maximale par PKAc sur l'élément Tpit/Pitx1-RE. Pour ce faire, j'ai utilisé une banque de vecteurs d'expression précédemment générée par Gwendal Le Martelot qui codent pour différentes formes tronquées de la protéine Tpit ainsi qu'une série de trois mutants SRC-2 fournis et décrits par le laboratoire du Dr Gronemeyer (Benecke *et al.*, 2000). La capacité de potentialisation transcriptionnelle du combo PKAc + SRC-2 sur l'activité de Tpit n'est pas abolie par les délétions progressives dans le domaine carboxy-terminal de Tpit ($\Delta C1$, $\Delta C2$, $\Delta C3$ et $\Delta C4$) et se maintient autour de 13 fois. Cependant, la délétion de la majeure partie du domaine amino-terminal (mutant $\Delta N2$) ne réduit pas le potentiel transcriptionnel de la protéine tronquée comparé à la protéine Tpit entière (résultat non-publié mais démontré en transfection transitoire par Anne-Marie Pulichino pour une quantité équivalente de protéine) mais bloque complètement la potentialisation

dépendante de PKAc + SRC-2 (Figure 3.4A). Le domaine amino-terminal de Tpit est donc essentiel pour obtenir l'effet synergique de la surexpression PKAc + SRC-2. Afin d'expliquer ce résultat, j'ai généré le vecteur pour la protéine de fusion Tpit Δ N2 (MBP- Δ N2) afin de comparer à celle de MBP-Tpit sa capacité d'interaction avec SRC-2. Lorsque les 30 premiers acides aminés du domaine amino-terminal sont retirés, l'interaction *in vitro* observée normalement entre MBP-Tpit et SRC-2 n'est plus possible (Figure 3.4B). Les mêmes expériences ont été reproduites pour déterminer le domaine d'importance dans SRC-2 cette fois-ci. La co-transfection de PKAc et des différents mutants SRC-2 montre que lorsque la région Q est enlevée (mutant Δ Q ou Δ Qm123) de la protéine entière, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Tpit sur le Tpit/Pitx1-RE se limite à l'effet de la surexpression de PKAc seulement (Figure 3.4C). Par ailleurs, la mutation des trois domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID) (mutant m123) ne cause pas d'effet marqué dans cette expérience de transfection transitoire. La région riche en glutamine (Q) est donc requise pour la potentialisation de l'activité de Tpit dépendante de PKAc + SRC-2. Ce résultat corrèle avec la perte d'interaction directe *in vitro* entre MBP-Tpit et les mutants qui n'ont plus leur région Q (Figure 3.4D).

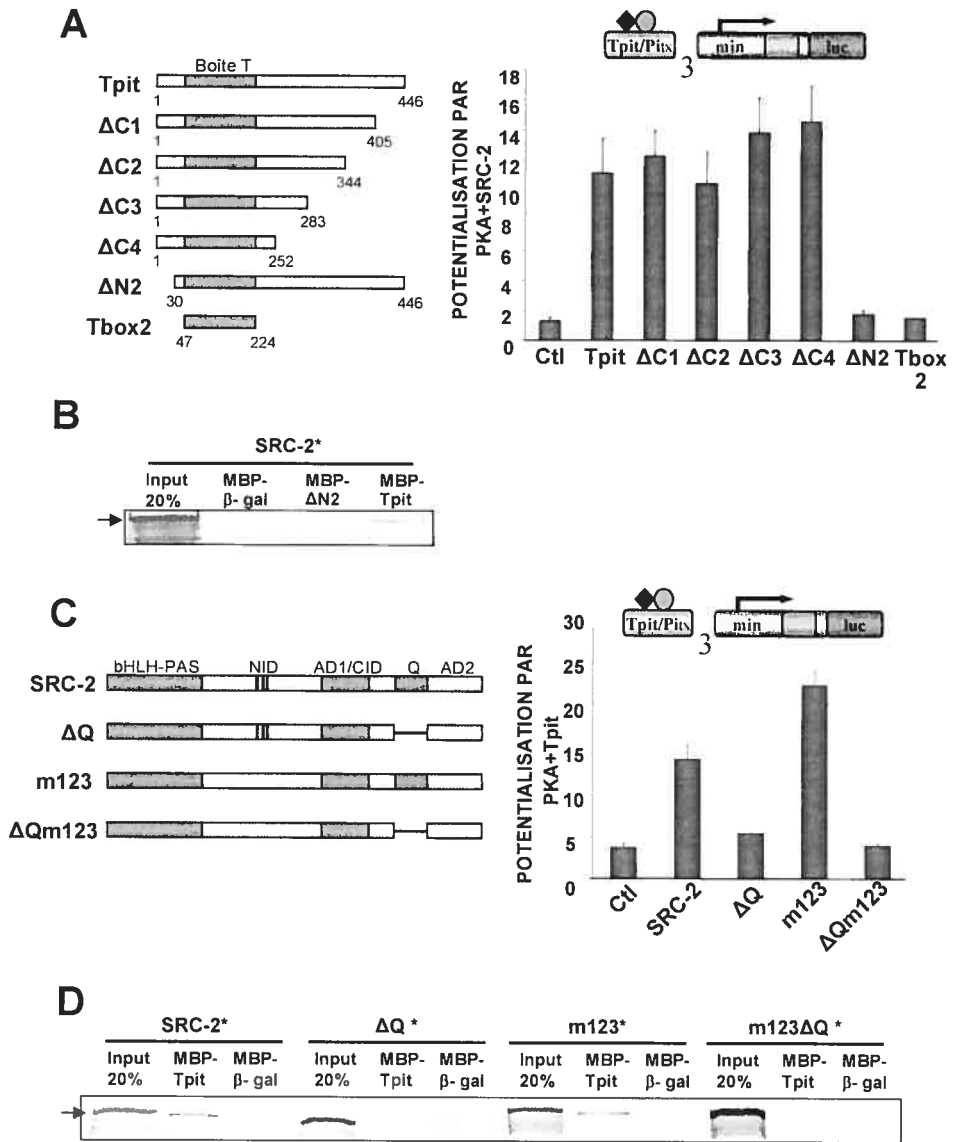


Figure 3.4 Identification des domaine(s) protéique(s) d'importance dans les protéines Tpit et SRC-2. La synergie entre la voie de signalisation PKA et le coactivateur SRC-2 requiert la partie N-terminale de Tpit (A) puisque la délétion de cette partie (mutant ΔN2) empêche l'interaction *in vitro* avec SRC-2 (B). Dans la protéine SRC-2, la région Q riche en glutamine est nécessaire pour obtenir l'effet synergique entre PKA et SRC-2 sur Tpit (C). La délétion de cette région (mutant ΔQ) entraîne également la perte d'interaction entre SRC-2 et Tpit (D).

3.5 La phosphorylation des coactivateurs est essentielle à leur synergie avec la voie PKA pour l'activation de Tpit

La phosphorylation des coactivateurs de la famille SRC/p160 est souvent responsable de la synergie entre coactivateurs et signalisation puisqu'elle est dans plusieurs cas, une étape déterminante pour leur recrutement et leur interaction avec les facteurs ciblés. Cependant, un même coactivateur peut agir dans sa forme phosphorylée ou déphosphorylée tout dépendant du facteur avec lequel il interagit (Rowan et al., 2000; Coleman et al., 2003). Afin de déterminer l'importance de la phosphorylation des coactivateurs pour leur effet synergique avec la voie CRH/AMPC/PKA sur l'activité transcriptionnelle de Tpit sur le site CE-3, j'ai comparé en transfection transitoire le potentiel de coactivation des protéines SRC-1 et SRC-2 à celui des mutants non-phosphorylables (mutation en alanine de tous les sites de phosphorylation) correspondants SRC-1(7A) et SRC-2(S736A). J'ai aussi tenté l'expérience avec le facteur Nur77 sur son élément de réponse NurRE pour compléter l'étude réalisée dans le laboratoire sur les mécanismes impliqués dans la réponse à la CRH médiée par les facteurs Nur sur le promoteur du gène POMC. Dans le cas de Tpit, la synergie entre la cascade de signalisation CRH/AMPC/PKA et les coactivateurs rehausse fortement l'activité transcriptionnelle de Tpit. Cependant, la transfection du mutant SRC-1(7A) au lieu de la protéine sauvage ramène le niveau d'activation à environ 4 fois, soit l'équivalent de l'effet de la surexpression seule de PKA sur l'activité de Tpit (indiqué par la ligne pointillée) (Figure 3.5A). Le même résultat est observé avec le mutant SRC-2(S736A) (Figure 3.5B). Le mécanisme d'activation du potentiel transcriptionnel de Tpit par la signalisation et le recrutement de coactivateurs est donc dépendant d'une phosphorylation adéquate de SRC-1 et SRC-2. Ce résultat suggère même que la voie

CRH/AMPC/PKA pourrait induire la phosphorylation des coactivateurs pour faciliter leur interaction avec Tpit. Pour ce qui est de Nur77, la co-transfection des vecteurs d'expression PKAc et de la protéine SRC-1, que ce soit la forme sauvage ou la forme mutante (SRC-1(7A)), résulte en un très fort rehaussement de l'activité transcriptionnelle de Nur77 (Figure 3.5C). Contrairement à Tpit, la synergie entre PKAc et le cofacteur SRC-1 observé sur Nur77 ne requiert pas d'événement de phosphorylation du coactivateur puisque la synergie avec le coactivateur et les voies de signalisation est aussi efficace malgré la surexpression de la forme non-phosphorylable de SRC-1 (SRC-1(7A)). La cascade CRH/AMPC/PKA pourrait donc agir au niveau du facteur de transcription Nur77 plutôt que sur le coactivateur, toujours dans le but de favoriser l'interaction entre le facteur de transcription et le coactivateur.

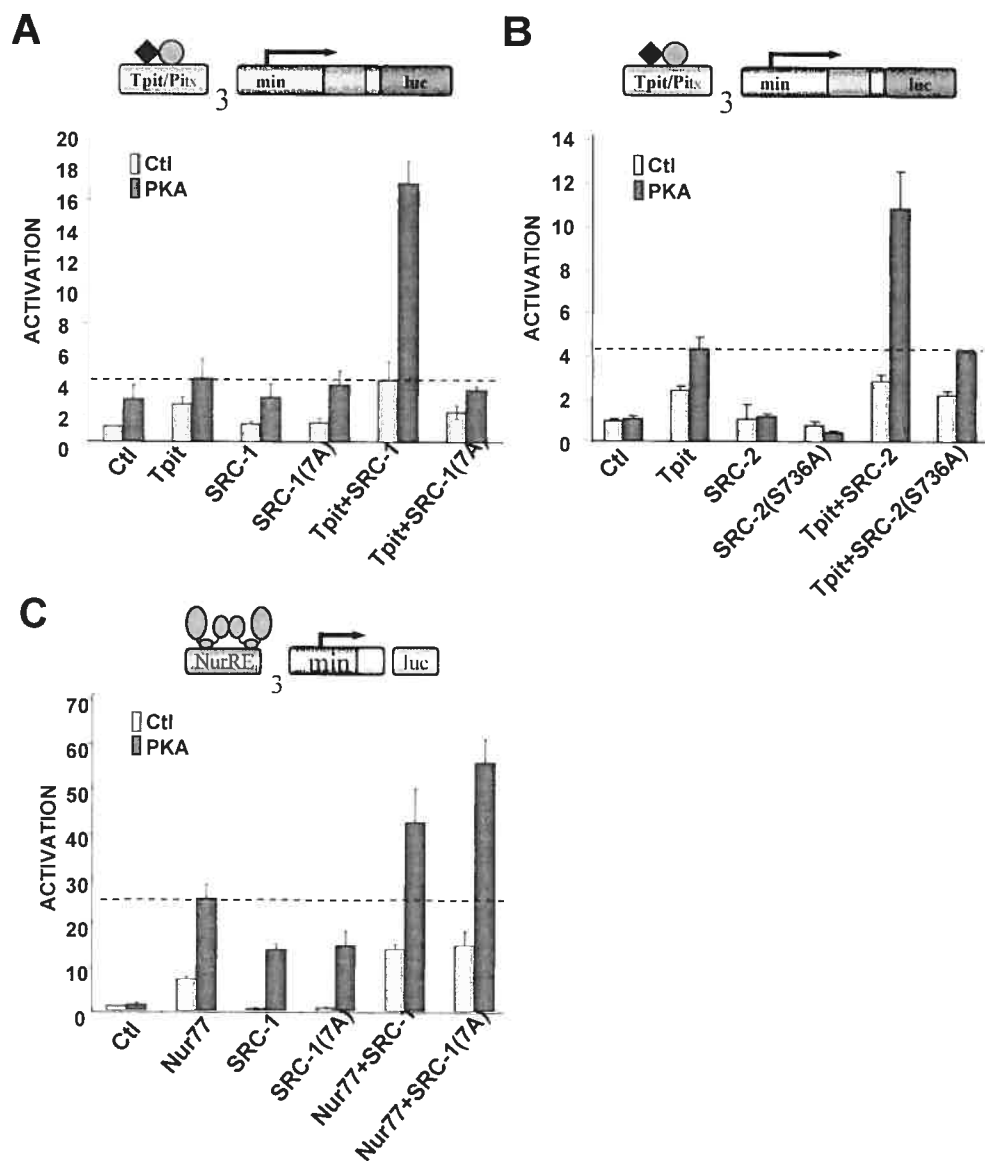


Figure 3.5 La phosphorylation des coactivateurs SRC est essentielle à leur synergie avec la voie PKA sur l'activité de Tpit. Le fort rehaussement de l'activité de Tpit obtenu par la co-transfection de PKA et de SRC-1 est complètement bloqué si les sept sites de phosphorylation dans SRC-1 sont mutés (A). La mutation du résidu 736 de SRC-2 bloque également son effet synergique avec PKA sur Tpit (B). Le médiateur Nur77 agit différemment puisque la synergie entre les coactivateurs et la voie PKA est indépendante de l'état de phosphorylation de SRC-1 (C).

3.6 Tpit est une cible directe des voies de signalisation

L'activité transcriptionnelle de Tpit est positivement régulée par la voie de signalisation CRH/AMPC/PKA qui cause possiblement la phosphorylation des coactivateurs et favorise l'interaction entre SRC et Tpit. Cependant, l'effet de la cascade pourrait tout aussi bien être nécessaire pour induire des modifications post-traductionnelles directement sur Tpit toujours dans le but de favoriser son interaction avec les membres SRC. Afin de vérifier si Tpit peut subir différentes modifications post-traductionnelles dans différentes conditions, j'ai procédé à une étude d'isofocalisation bi-dimensionnelle. Les cellules corticotropes AtT-20, maintenues à un état transcriptionnel basal dans un milieu de culture faible en sérum, ont été soumises à différentes conditions (cellules non-stimulées (Ctl), stimulées avec la CRH 10^{-7} M ou traitées avec l'inhibiteur PD98059 50 μ M avant la stimulation avec la CRH 10^{-7} M). Les extraits protéiques obtenus ont été séparés selon leur point isoélectrique (pI, séparation horizontale) et selon leur poids moléculaire (MW, séparation verticale). La protéine Tpit a ensuite été révélée par immunobuvardage (Figure 3.6A, B et C). De plus, l'équivalence entre les quantités d'extraits utilisées pour chacune des conditions a été validée par immunobuvardage avec les anticorps anti-Tpit et anti-MAPK (Figure 3.6D). L'immunobuvardage avec l'anticorps anti-phospho MAPK confirme que la CRH induit la voie MAPK (forte concentration de la forme phosphorylée dans la condition stimulation avec la CRH 10^{-7} M) et que le traitement avec l'inhibiteur bloque totalement l'activité de MEK1, et de la voie entière par conséquent (Figure 3.6D). Dans la condition contrôle, trois formes distinctes de Tpit sont détectées et identifiées 1, 2 et 3. Les formes 2 et 3 semblent prédominantes tandis que la forme ayant le pI le plus acide (forme 1) semble présente en très faible quantité. Un signal est aussi détecté dans les pH plus basiques et identifié par

une accolade numérotée 4 puisqu'il n'est pas possible d'y distinguer de points bien définis (Figure 3.6A). La stimulation avec la CRH entraîne une augmentation de la quantité de forme 1 et une réduction de la quantité de forme 3 ainsi qu'une intensification du signal sous l'accolade (Figure 3.6B). Le blocage de la voie MAPK avec l'inhibiteur de MEK1 (PD98059) semble annuler les effets d'une stimulation CRH puisque la forme 1 disparaît complètement, que la quantité de la forme 2 diminue et que la forme 3 est presque indétectable. Le signal dans les pH basiques demeure cependant présent (Figure 3.6C). Ces résultats montrent donc qu'il existe différentes formes (ayant des pI différents mais un poids moléculaire semblable) de la protéine Tpit qui sont différemment représentées entre les conditions contrôle, CRH et CRH + PD98059. Les variations des formes 1, 2 et 3 entre les conditions CRH et CRH + PD98059 suggèrent que certaines modifications post-traductionnelles sont dépendantes de la voie CRH, et plus spécifiquement de la voie MAPK puisque le patron de détection est modifié avec l'ajout du traitement avec l'inhibiteur PD98059. Le déplacement du signal vers un pH plus acide en condition CRH suggère que les modifications apportées sur Tpit sont chargées négativement. Pour ce qui est du signal sous l'accolade 4, il correspond possiblement à une forme modifiée de Tpit qui apparaît en réponse à la CRH, mais qui est indépendante de la voie AMPc/PKA/MAPK puisque le traitement avec l'inhibiteur de MEK1 (PD98059) n'affecte pas ce signal. Étant donné que cette forme de Tpit s'immobilise à un pH beaucoup plus basique et suggère ainsi l'addition de charge positive, l'acétylation pourrait être une modification à proposer puisqu'elle répond à ce critère. La variation dans la quantité totale de protéine Tpit reflète probablement plus un problème au niveau du transfert des protéines du gel vers la membrane pour le signal sous l'accolade 4 dans la Figure 3.6A qu'une réelle augmentation d'autant plus que l'immunobuvardage

contrôle avec l'anti-Tpit ne montre pas de variation dans le niveau de la protéine (Figure 3.6D).

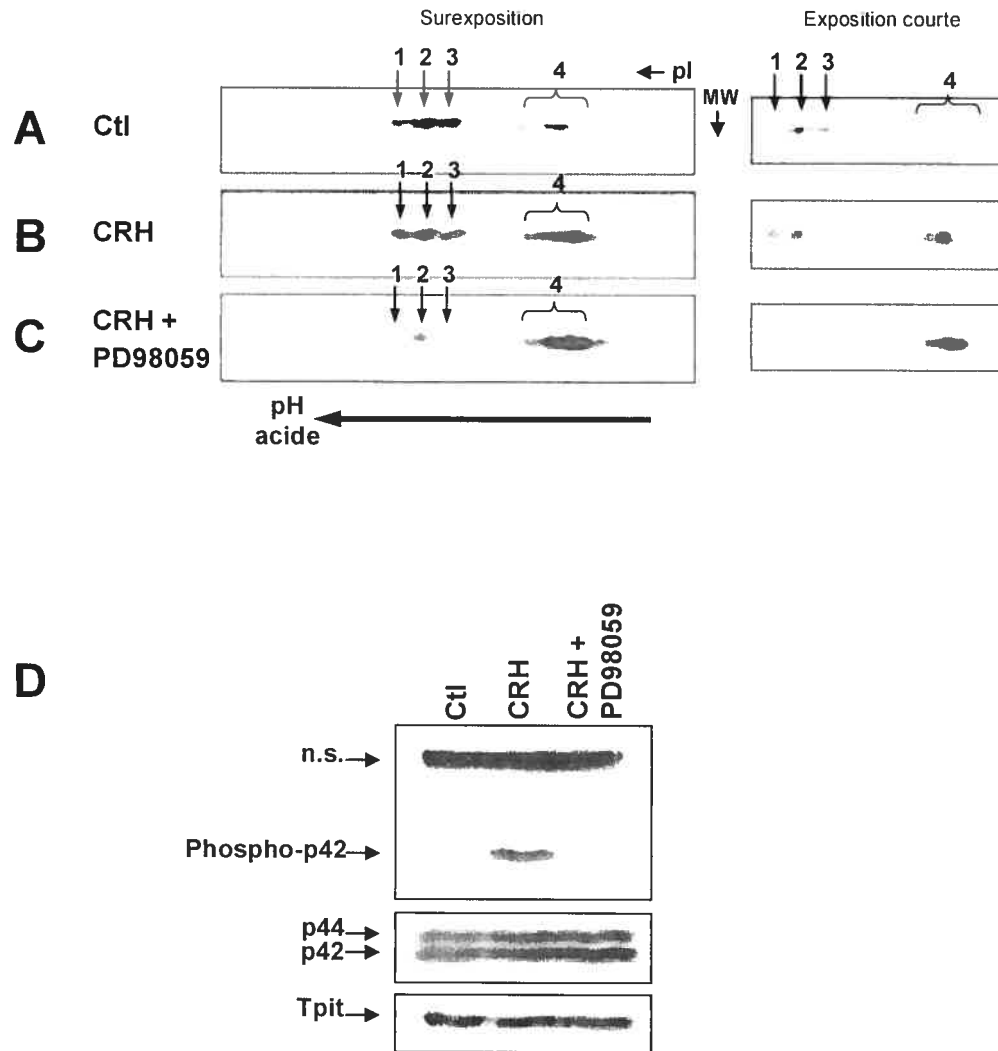


Figure 3.6 Tpit est la cible des voies de signalisation; la voie induite par la CRH mène à des modifications post-traductionnelles sur la protéine Tpit. La stimulation CRH (10^{-7} M) (B) génère une forme modifiée de Tpit qui migre vers un pH plus acide que dans la condition contrôle (faible en sérum) (A). Le traitement avec l'inhibiteur de MEK1 (PD98059 50 μ M) bloque la production de cette forme modifiée de Tpit et génère seulement les formes qui migrent vers un pH plus basique (C). Les immunobuvardages contrôles confirment que la CRH active la voie MAPK (détection de phospho-p42 MAPK) et que le traitement PD98059 la bloque (D).

3.7 Séquences cibles pour la phosphorylation dans la protéine Tpit

Comme démontré dans la figure précédente, différentes modifications post-traductionnelles sont apportées sur la protéine Tpit par la cascade de signalisation CRH/AMPC/PKA/MAPK. Puisque la voie CRH stimule l'activité de kinases ERK1/2 en fin de cascade et que les résultats d'isofocalisation en deux dimensions suggèrent que les modifications sont chargées négativement, j'ai commencé l'étude des sites de phosphorylation dans la protéine Tpit. J'ai analysé l'effet de mutations dirigées contre des sites potentiels de phosphorylation prédits dans la séquence de la protéine Tpit par des programmes de bio-informatiques. Trois acides aminés (Thr 264, Ser 349 et Ser 388) sont situés à l'intérieur de séquences consensus pour l'activité des MAPK. J'ai donc transformé ces trois acides aminés en alanine pour empêcher leur phosphorylation. Les mutants Tpit générés ont ensuite été co-transfectés avec les vecteurs d'expression PKA et SRC-2 afin d'étudier l'importance de ces sites pour l'obtention du rehaussement synergique de Tpit par PKA + SRC-2 sur l'élément Tpit/Pitx1-RE. J'ai aussi testé le mutant naturel Tpit T58A non-fonctionnel découvert chez un patient présentant un déficit isolé en ACTH pour déterminer si la mutation de la thréonine 58 bloque l'effet synergique PKA + SRC-2 et conclure sur l'importance de cette thréonine dans le mécanisme d'activation de Tpit. Les trois mutants simples (T264A, S349A et S388A) ainsi que le triple mutant (3M) sont tous activés par la surexpression de SRC-2 (2 fois), de PKA (3 fois) ou de PKA + SRC-2 (8 fois) et ce, de façon équivalente au Tpit sauvage (Figure 3.7A). L'insertion de mutations n'affecte pas le niveau d'expression des mutants. Il en est de même pour le mutant naturel de Tpit (T58A) qui répond de façon identique au Tpit sauvage (Figure 3.7B). Le niveau d'expression du mutant T58A a aussi été vérifié ainsi que son affinité à l'ADN puisque la mutation T58A est située à l'intérieur du

domaine de liaison à l'ADN. Quoique incapable de dimériser sur la cible palindromique de brachyury, le mutant T58A conserve une affinité résiduelle de liaison à l'ADN en monomère qui est suffisante pour observer l'effet PKA + SRC-2 sur son potentiel transcriptionnel basal diminué par la mutation. Les acides aminés Thr 264, Ser 349, Ser 388 et Thr 58 ne semblent pas être phosphorylés ou du moins, la phosphorylation de ces sites n'est pas requise pour la potentialisation par PKA + SRC-2. Un essai kinase *in vitro* a aussi été réalisé pour déterminer si Tpit peut être un substrat pour la MAPK ERK1. ERK1 s'autophosphoryle et sert de contrôle positif interne mais l'absence de signal radioactif sur la protéine de fusion MBP-Tpit montre que Tpit n'est pas directement phosphorylé par la kinase ERK1 *in vitro* (Figure 3.7C).

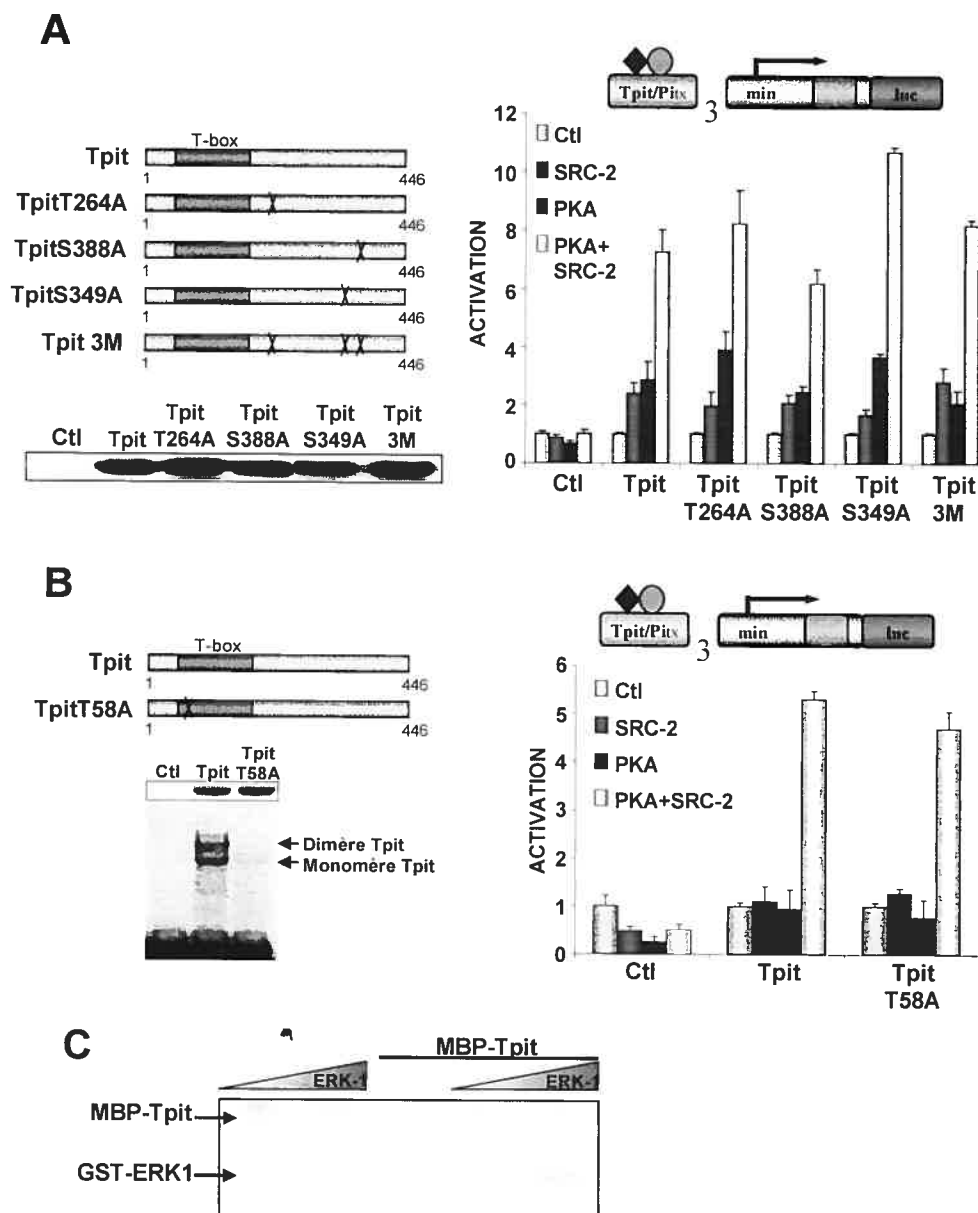


Figure 3.7 Séquences cibles de Tpit pour la phosphorylation. Les sites de phosphorylation prédits ne semblent pas être responsables de l'effet SRC + PKA puisque la co-transfection de SRC-2 et PKA rehausse aussi efficacement l'activité des mutants T264A, S388A, S349A (A) et T58A (B) que le Tpit sauvage. La kinase ERK1 située à la fin de la cascade CRH/PKA/MAPK est incapable de phosphoryler la protéine de fusion MBP-Tpit en essai kinase *in vitro* (C).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

CHAPITRE 4. DISCUSSION

Les facteurs de transcription à boîte T sont exprimés tôt dans l'embryon et leur expression est maintenue chez l'adulte. Plusieurs rôles leur ont été attribués principalement au cours du développement, lors de la décision du sort cellulaire, de la spécification de la structure embryonnaire ou de l'organogenèse par exemple (Naiche et al., 2005). Malgré l'importance de cette famille de facteurs de transcription, la littérature ne contient que très peu d'informations sur les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs à boîte T. Dans le cas de *Tpit*, il a déjà été démontré qu'il est impliqué dans la différenciation terminale des cellules corticotropes de l'hypophyse grâce à sa fonction de régulateur positif de l'expression du gène *POMC* (Lamolet *et al.*, 2001; Pulichino *et al.*, 2003b). Je propose maintenant un rôle de *Tpit* chez l'adulte au cœur même de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, fonction qui permet même de justifier le maintien de l'expression de *Tpit* chez l'adulte. Les travaux présentés dans ce mémoire décrivent les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur à boîte T *Tpit* au cours de la régulation hormonale par la CRH du gène *POMC*.

À ce propos, le laboratoire avait précédemment démontré, à l'aide de transfections transitoires du plasmide rapporteur *Tpit/Pitx1-RE₃* dans les cellules corticotropes AtT-20, que le potentiel transcriptionnel de l'élément de réponse pour les facteurs *Tpit* et *Pitx1* est rehaussé par une stimulation CRH ou forskoline (activateur de l'adénylate cyclase, et conséquemment de la PKA) (Annexe 1A, 2A et B). Ces stimulations, combinées à un traitement PD98059 (inhibiteur de la MAPKK MEK1), n'ont cependant plus aucun effet activateur sur l'élément *Tpit/Pitx1-RE* (Annexe 2A et B). L'importance des deux sites de liaison contenus dans cet élément de réponse a aussi

été étudiée et les résultats confirment que Tpit et Pitx1 sont nécessaires pour cette réponse hormonale (Annexe 1B). Ces résultats ont donc mené à la conclusion que l'élément Tpit/Pitx1-RE est sous la régulation de la voie AMPc/PKA/MAPK activée par la CRH. J'ai donc procédé à la caractérisation des mécanismes sous-jacents à cette action de la signalisation induite par la CRH sur le potentiel transcriptionnel du Tpit/Pitx1-RE. L'activité transcriptionnelle de Tpit est régulée par la synergie entre l'activité de la voie AMPc/PKA et le recrutement de coactivateurs SRC/p160. Ce mécanisme requiert la modification post-traductionnelle des coactivateurs ainsi que de Tpit, possiblement à l'intérieur des domaines protéiques d'importance identifiés dans chacun d'eux.

4.1 Mécanisme(s) responsable(s) de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Tpit

L'action des facteurs à homéodomaine Pitx sur leurs gènes cibles est, dans plusieurs cas, couplée à celle de facteurs de transcription à expression restreinte afin d'obtenir un effet maximal sur la transcription. Au niveau de l'hypophyse seulement, Pitx1 peut entre autre réguler la transcription de l'hormone LH β avec SF-1 dans les cellules gonadotropes ou de la GH/PRL avec Pit-1 dans les cellules somato-lactotropes (Szeto *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1998). Dans les cellules corticotropes, Pitx1 agit avec son partenaire Tpit sur un élément nommé Tpit/Pitx1-RE qui est soumis à la régulation par l'hormone hypothalamique CRH et sa cascade intracellulaire qui fait intervenir les kinases PKA et MAPK ERK1/2. On ne sait cependant pas lequel des deux facteurs est la cible de cette voie de signalisation. Dans le travail présent, je démontre que l'activité transcriptionnelle de Tpit sur l'élément Tpit/Pitx1-RE est fortement rehaussée par la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA. Le facteur à boîte T Tpit est donc une

cible de la voie AMPc/PKA/MAPK qui a pour effet de le modifier post-traductionnellement afin de rehausser son activité transcriptionnelle (Figures 3.3, 3.4 et 3.6). Jusqu'à ce jour, il n'existe que très peu d'exemples décrits dans la littérature de facteurs à boîte T dont l'activité est modulée par une cascade de signalisation. En fait, des événements de phosphorylation sont caractérisés pour deux facteurs à boîte T seulement, mais les voies de signalisation et les kinases impliquées n'ont toutefois pas encore été identifiées. Des études montrent que la phosphorylation d'un seul résidu dans la protéine Tbx2 serait responsable de la localisation cytoplasmique et de la dégradation subséquente de ce facteur. Inversement, la déphosphorylation de ce résidu entraînerait la translocation de Tbx2 dans le noyau où il pourrait effectuer son rôle de répresseur transcriptionnel sur l'ADN (Gibert and Begemann, 2002). Ce mécanisme de régulation de la translocation et de la dégradation ne semble pas s'appliquer à Tpit puisque l'expression de Tpit est détectée dans le noyau uniquement (autant pour la protéine endogène dans les cellules AtT-20 traitées ou non, que le Tpit exogène surexprimé avec ou sans PKAc dans les cellules CV-1 (données vérifiées mais non-publiées par Anne-Marie Pulichino et Mario Maira)) et que l'immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre la protéine Tpit sur des extraits protéiques nucléaires présenté dans la figure 3.1D ne montre aucune variation de son niveau d'expression dans les différentes conditions de stimulation, ce qui s'oppose à une possible translocation ou dégradation de la protéine lorsque la cascade est activée par la CRH. La deuxième publication caractérise un site de phosphorylation dans la protéine T-bet nécessaire à son rôle de répresseur transcriptionnel du gène IL-2. Dans ce cas, la phosphorylation de la Ser508, située dans la partie C-terminale très peu conservée entre les facteurs à boîte T, favorise l'hétérodimérisation entre T-bet et le facteur de transcription RelA qui possède un site de

liaison situé à environ 10 nucléotides de celui de T-bet. Cette interaction permet à T-bet de réprimer la transcription RelA-dépendante du gène IL-2 (Hwang et al., 2005). Les modifications post-traductionnelles obtenues suite à l'activation de voies de signalisation peuvent donc favoriser les interactions protéiques, mais ce n'est pas le cas pour Tpit et son partenaire transcriptionnel Pitx1 puisque la surexpression de PKA n'augmente pas la capacité de ces deux facteurs à interagir ensemble (résultat de co-immunoprécipitation généré par Mario Maira, Annexe 3). À première vue, le résultat aurait pu être prévisible puisque le résidu Ser508 de T-bet n'est pas conservé dans la séquence protéique de Tpit. Cependant, étant donné que seul le domaine de liaison est conservé entre les facteurs à boîte T et que la partie C-terminale est très variable, un résidu équivalent à la Ser508 aurait pu se trouver dans la protéine Tpit et effectuer la même fonction, ce qui ne semble finalement pas le cas pour l'interaction entre Tpit et Pitx1, son seul partenaire connu sur le promoteur du gène POMC.

Puisque Tpit est un facteur de transcription qui, par définition, doit se lier à l'ADN pour transactiver le promoteur de son gène cible, son affinité de liaison à l'ADN a été vérifiée dans différentes conditions, toujours dans le but de déterminer quel est l'effet de l'activation de la cascade CRH/AMPC/PKA qui mène à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Tpit. Bien sûr, il aurait été plus spectaculaire d'utiliser la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour analyser les variations dans l'occupation du promoteur par Tpit selon les différentes conditions puisque cette méthode reflète plus fidèlement ce qui se passe dans la cellule. Effectivement, cette technique permet l'identification des cibles sur l'ADN génomique dans son contexte chromatinien d'une protéine endogène spécifique. L'utilisation de cellules corticotropes AtT-20 qui expriment le récepteur CRHR1 à leur surface aurait aussi permis de faire une

stimulation avec une dose physiologique de CRH. Toutefois, les anticorps disponibles dirigés contre la protéine Tpit étant inefficaces dans ce type d'expérience, la méthode *in vitro* de retard sur gel a donc été utilisée pour étudier l'affinité de liaison à l'ADN de Tpit. On aurait pu s'attendre à ce que la voie CRH/AMPC/PKA augmente la capacité de liaison de Tpit, ce qui n'est pas le cas puisque la surexpression de PKA n'entraîne aucun changement sur cette propriété (Figure 3.1C). Les quelques indices fournis par la littérature n'ont donc pas été d'une grande aide, puisque après vérification, aucun des mécanismes proposés ne s'appliquent à Tpit.

4.2 Recrutement de coactivateurs par Tpit

Les premiers efforts de caractérisation du mécanisme responsable de la régulation de l'activité transcriptionnelle de Tpit par la voie CRH/AMPC/PKA n'ayant pas été fructueux, l'inspiration pour une nouvelle hypothèse à tester est née du modèle d'action des facteurs Nur dans la régulation hormonale du promoteur du gène POMC. L'interaction des coactivateurs de la famille SRC/p160 avec le domaine N-terminal hyperphosphorylé des récepteurs nucléaires Nur est une étape importante pour la réponse hormonale adéquate sur l'élément de réponse NurRE (Maira *et al.*, 2003b). J'ai donc intégré les coactivateurs dans mes travaux. Les expériences présentées dans ce travail montrent que les coactivateurs de la famille SRC/p160 sont recrutés par le facteur Tpit vraisemblablement par interaction directe *in vitro* (puisque seules les protéines d'intérêt sont présentes) et modulent l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Figures 3.2A, B et C). Comme mentionné précédemment, malgré que les coactivateurs SRC/p160 ont d'abord et avant tout été décrits pour leur fonction avec les récepteurs nucléaires, de nouveaux exemples d'interaction avec des facteurs de transcription de toutes sortes sont

de plus en plus rapportés et reflètent l'ampleur du mécanisme transcriptionnel de recrutement de cofacteurs nécessaire à la réorganisation de la chromatine et à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle. Cependant, il n'existe qu'un seul exemple décrit d'interaction entre un facteur de transcription à boîte T et un cofacteur. C'est le cas du recrutement de CASK/LIN-2, une guanylate kinase normalement associée à la membrane, qui transloque au noyau où elle interagit avec la protéine nucléaire Tbr-1 liée à son élément de réponse T pour former un complexe capable de transactiver fortement un gène cible (Hsueh et al., 2000). Les auteurs de cet article précisent que les 340 derniers acides aminés en C-terminal du facteur à boîte T Tbr-1 sont nécessaires et suffisants pour obtenir une interaction adéquate entre les deux partenaires. Toutefois, les résultats obtenus dans l'étude du facteur Tpit démontrent que c'est le domaine N-terminal de Tpit qui interagit avec les coactivateurs SRC/p160 et que la délétion de cette région bloque complètement l'interaction Tpit-SRC ainsi que le rehaussement de l'activité de Tpit par la synergie PKA et les SRC (Figure 3.4A et B). Les domaines variables des facteurs à boîte T sont donc, dans les deux cas, responsables des interactions protéiques observées. À la lumière de ces observations, l'évolution de la séquence protéique des domaines C-terminal et N-terminal est probablement responsable de l'attribution de partenaires spécifiques à chacun des facteurs à boîte T et par conséquent, à la base de leurs divergences fonctionnelles.

4.3 Modifications post-traductionnelles du facteur à boîte T Tpit

Les résultats de transfections transitoires présentés dans ce mémoire montrent l'importance de la voie de signalisation AMPc/PKA dans la réponse à l'hormone hypothalamique CRH médiée par le facteur de transcription Tpit sur le site Tpit/Pitx1-RE

et ont, par conséquent, introduit la notion de modifications post-traductionnelles dans le projet. Les expériences d'isofocalisation bidimensionnelle réalisées par la suite démontrent que la protéine est effectivement soumise à une régulation post-traductionnelle puisque selon les conditions de stimulation, Tpit se présente sous différentes formes (correspondant à différents pI) qui sont distinctes de celles détectées dans la condition contrôle (Figure 3.6A, B et C). Ces modifications pourraient donc être la cause de l'augmentation de l'interaction protéique entre Tpit et les coactivateurs SRC/p160. Cependant, pour arriver à étudier cette hypothèse, l'identification de la nature des modifications ainsi que les acides aminés ciblés est nécessaire. L'analyse du résultat d'isofocalisation bidimensionnelle révèle quelques indices intéressants. D'abord, le déplacement du signal Tpit vers un pH plus acide avec la stimulation CRH suggère à première vue que les modifications résultantes sont chargées négativement. Les modifications doivent également posséder une masse moléculaire négligeable puisque la migration dans la deuxième dimension sur gel de polyacrylamide ne varie pas entre les différentes formes de la protéine Tpit. De plus, la voie de signalisation initiée par l'hormone hypothalamique CRH est essentiellement basée sur une communication à relais entre différentes kinases, soit PKA d'abord et de toute la cascade MAPK par la suite. Ainsi, ces trois observations suggèrent que la phosphorylation est probablement le type de modification retrouvé sur la protéine Tpit. L'analyse bio-informatique de la séquence protéique de Tpit à l'aide de différents programmes a d'ailleurs prédit trois sites potentiels de phosphorylation pour la MAPK ERK1. Les trois acides aminés ciblés, soit deux sérines (Ser349, Ser388) et la thréonine (T264), sont tous situés dans le domaine carboxy-terminal. Cependant, dans la figure 3.4A, j'ai identifié le domaine amino-terminal de Tpit comme étant nécessaire au rehaussement de son activité

transcriptionnelle par PKA + SRC-2. Dans la figure 3.4B, je confirme que ce même domaine N-terminal est suffisant pour permettre l'interaction *in vitro* de Tpit avec les coactivateurs SRC/p160. Puisque l'hypothèse de travail suggère que les modifications favorisent l'interaction, il aurait été logique d'en retrouver dans le domaine d'interaction N-terminal de Tpit comme dans l'exemple de T-bet mentionné plus haut pour lequel la phosphorylation régule son activité transcriptionnelle, principalement en modulant son interaction avec RelA, un autre facteur lié sur l'ADN (Hwang *et al.*, 2005). L'effet de la mutation en alanine (acide aminé non-phosphorylable) de ces trois sites potentiels de phosphorylation situé dans le C-terminal a tout de même été étudié puisque la phosphorylation peut, dans certains cas, être impliquée dans le changement de conformation globale de la protéine nécessaire à la phosphorylation subséquente d'un autre acide aminé ou à la libération d'un domaine d'interaction maintenu inactif au centre de la protéine (Rayala et al., 2006). La mutation de chacun des trois sites potentiels de phosphorylation dans le C-terminal en une forme non-phosphorylable n'interfère cependant pas avec le rehaussement de l'activité transcriptionnelle de Tpit par SRC-2 + PKA (Figure 3.7A). De plus, la kinase ERK1 ne semble pas avoir la capacité de phosphoryler *in vitro* la protéine de fusion Tpit (Figure 3.7C). Plusieurs faiblesses dans cette technique pourraient expliquer ce résultat négatif. Effectivement, la présence de la fusion MBP juxtaposée au N-terminal pourrait empêcher son entrée dans le site catalytique de la kinase et bloquer toute modification. Aussi, étant donné qu'il n'y a qu'une kinase testée par essai, des modifications pré-requises pourraient être manquantes et empêcher la phosphorylation. Enfin, la kinase ERK1 testée n'est peut-être tout simplement pas la bonne et devrait peut-être simplement être remplacée par ERK2. Quoiqu'il en soit, l'approche bio-informatique utilisée ne nous a pas renseigné ni sur la

nature des modifications effectuées sur Tpit ni sur les acides aminés ciblés. Puisque cet objectif est un projet en soi, des efforts devraient être investis dans la purification d'une quantité suffisante de la protéine Tpit dans chacune des conditions afin d'analyser et de comparer les différents échantillons par la technique de spectrométrie de masse Q-TOF de plus en plus utilisée parce qu'elle génère des informations non seulement sur les peptides modifiés mais aussi sur le type de modifications. Par la suite, il serait possible de faire la mutation des acides aminés ciblés par les modifications et de déterminer si cela affecte la synergie PKA + SRC et/ou l'interaction avec les coactivateurs afin de confirmer nos hypothèses.

4.4 Modifications post-traductionnelles des coactivateurs SRC/p160

Comme mentionné précédemment, différents groupes ont démontré que la phosphorylation des coactivateurs de la famille SRC/p160 est nécessaire à leur fonctionnement. Par la suite, des résultats supplémentaires ont plutôt proposé que le besoin de phosphorylation varie selon le partenaire d'interaction. Sur le promoteur du gène POMC, les deux exemples sont illustrés. D'un côté, il y a Tpit dont l'activité transcriptionnelle est rehaussée par la version phosphorylée de SRC-1 seulement, ce qui suggère que la phosphorylation pourrait être importante pour faciliter l'interaction entre les deux protéines. Cette possibilité pourrait être vérifiée *in vitro* en essai d'interaction protéique avec le mutant radioactif SRC-1 non-phosphorylable (produit en traduction *in vitro* avec de la méthionine ^{35}S) et la protéine de fusion MBP-Tpit. Une approche de co-immunoprécipitation entre la protéine Tpit endogène et SRC-1 ou SRC-1(7A) pourrait aussi être envisagée dans des cellules AtT-20 contrôles ou traitées avec la CRH. Cependant, l'expérience nécessiterait la surexpression en transfection transitoire ou la

production de clones stables exprimant une version de SRC-1 ou de SRC-1(7A) possédant un épitope additionnel puisque aucun anticorps disponible ne reconnaît efficacement cette protéine endogène. De l'autre côté, il y a le facteur Nur77 dont le rehaussement de l'activité est indépendant de l'état de phosphorylation du coactivateur SRC-1 (Figure 3.5). Selon cette dernière donnée, le coactivateur semble maintenir sa capacité d'interaction avec le facteur de transcription peu importe sa forme (phosphorylée ou non). Dans ce cas, est-ce que la phosphorylation ne pourrait pas plutôt être un signal régulant les interactions avec un deuxième ordre de coactivateurs, multipliant ainsi les possibilités de combinaisons d'interactions et d'effets sur la transcription? Par exemple, Ping et al. ont montré que seule la forme phosphorylée de SRC-3 est capable d'interagir avec la peptidyl-prolyl isomérase 1 (Pin1) qui favorise à son tour l'interaction entre phospho-SRC-3 et l'histone acétyltransférase p300 (Yi et al., 2005). Les variations dans la phosphorylation semblent donc être à la base d'un code qui dicte les interactions qui sont permises ou non dans chaque situation, peu importe que ce soit avec les facteurs de transcription ou avec d'autres catégories de cofacteurs. La possibilité qu'un tel mécanisme s'applique à différents facteurs sur le promoteur du gène POMC n'est pas à exclure et suggère même de nouvelles pistes de recherche intéressantes.

4.5 Formation d'un complexe coactivateur au promoteur du gène POMC

Le recrutement de coactivateurs SRC/p160 est un mécanisme partagé par les deux facteurs médiateurs (Tpit et Nur) de la réponse à l'hormone hypothalamique CRH sur le promoteur du gène POMC. Cette observation amène la possibilité qu'une stimulation par l'hormone CRH déclenche l'assemblage d'un complexe protéique qui contiendrait

jusqu'à présent Tpit, les facteurs Nur et les coactivateurs SRC. Bien que très peu caractérisés, les autres facteurs médiateurs de la réponse au CRH sur le promoteur du gène POMC tels que CREB, AP-1 et PCRH-REB-1, pourraient aussi être intégrés dans le complexe. Bien fixé à l'ADN par les différents facteurs de transcription, ce complexe pourrait servir de point d'ancrage pour les protéines de remodelage de chromatine et la machinerie transcriptionnelle de base afin de maximiser la transcription du gène POMC. L'idée du recrutement d'un deuxième ordre de cofacteurs discuté dans la section précédente s'insère d'ailleurs très bien dans un contexte de formation d'un complexe multiprotéique. Afin d'obtenir une meilleure connaissance sur le sujet, il serait important de confirmer par la méthode de co-immunoprécipitation (CoIP) les interactions déjà observées en essai d'interaction protéique *in vitro*. Par la suite, il serait intéressant de continuer d'identifier les cibles de la voie de signalisation CRH/PKA/MAPK ainsi que les cofacteurs recrutés par les différents facteurs de transcription. Avec des expériences de CoIP réalisées avec les anticorps dirigés contre les facteurs de transcription impliqués, il serait possible de vérifier, pour chacun d'eux, s'ils forment des interactions directes ou indirectes avec une panoplie de protéines d'intérêt telles que l'histone acétylase CBP/p300, les sous-unités Brm/Brg-1 du complexe de remodelage de chromatine ATP-dépendant ou l'ARN polymérase II. Dans un même ordre d'idée, il serait intéressant de procéder à des essais de co-immunoprécipitation de la chromatine également dans le but d'identifier les composants du complexe, mais cette fois-ci en demeurant dans le contexte du promoteur POMC à l'étude. La comparaison des différentes interactions pour chacun des facteurs de transcription pourrait également donner des informations sur la nature du complexe parce qu'il est possible d'imaginer plusieurs scénarios d'organisation du complexe. Par exemple, il existe peut-être qu'un seul gros complexe comprenant tous les

éléments nécessaires à la transcription qui ne se lie que lorsqu'il y a stimulation ou, à l'inverse, différents petits complexes qui se fixent sur leurs facteurs de transcription respectifs et qui recrutent de façon indépendante les cofacteurs nécessaires à leur position précise sur le promoteur. Des différences majeures entre les interactions pour chacun des facteurs de transcription appuieraient l'option des différents petits complexes. En revanche, les protéines identifiées en CoIP pourraient aussi être éliminées individuellement de la cellule par la méthode d'interférence ARN pour ensuite regarder l'effet sur la réponse hormonale du promoteur entier. Dans ce cas, une grosse réduction de la réponse à la CRH supporterait plutôt la théorie du gros complexe commun. Peu importe quel sera le modèle, il devra prendre en considération que le niveau d'expression du gène POMC doit être dynamique et facilement modulable étant donné que la régulation positive par la CRH doit pouvoir être rapidement renversée par la boucle de rétroinhibition des glucocorticoïdes.

4.6 Rôle de renfort du partenaire transcriptionnel Pitx1

Les travaux présentés dans ce mémoire décrivent essentiellement les mécanismes régulant l'activité du facteur Tpit sur le site Tpit/Pitx1-RE du promoteur du gène POMC en réponse au signal hypothalamique CRH. Il est cependant intéressant de considérer l'importance du site pour le facteur Pitx1, puisque l'activité transcriptionnelle de Tpit sur ce même élément de réponse Tpit/Pitx1-RE est fortement rehaussée par la présence de son partenaire voisin Pitx1 (Lamolet *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA augmente l'activité transcriptionnelle de Pitx1 (environ 2 fois plus d'activation) sur le plasmide rapporteur Tpit/Pitx1-RE (Figure 3.1A). Pitx1 pourrait donc être soumis à des modifications post-traductionnelles induites par la signalisation CRH/AMPC/PKA et nécessaires à la régulation de son activité. L'analyse bio-

informatique de la séquence protéique de Pitx1 indique qu'elle contient un certain nombre de sites potentiels de phosphorylation, dont trois qui correspondent à la séquence consensus ciblée par les MAPK. De plus, Melamed et al. ont montré que Pitx1 est phosphorylé sur trois résidus (Melamed *et al.*, 2002). Ces observations combinées suggèrent fortement que Pitx1 est une cible des cascades de signalisation, et peut-être même des MAPK ERK1/2 directement, qui rappelons-le, sont activées par la CRH. Cette convergence de la voie de signalisation sur le facteur Pitx1 n'a cependant pas le même effet que sur le facteur Tpit puisqu'elle ne favorise pas le recrutement de coactivateurs de la famille SRC/p160. Effectivement, la double surexpression SRC-2 + PKA n'augmente pas davantage l'effet de l'unique surexpression de PKA sur l'activité de Pitx1 (Figure 3.3). De plus, Pitx1 est incapable d'interagir directement avec les coactivateurs SRC/p160 (Figure 3.2C). Un autre groupe a aussi tenté de démontrer, sans grand succès, une interaction entre Pitx1 et les coactivateurs remodeleurs de chromatine CBP et p300 (Melamed *et al.*, 2002). La signalisation pourrait donc être impliquée dans la modulation des interactions entre les facteurs de transcription sur le promoteur. Bien qu'il ait été rapporté que la phosphorylation de Pitx2 augmente sa capacité d'interaction avec le facteur à expression restreinte Pit-1 et favorise l'expression du gène de la prolactine dans les cellules lactotropes de l'hypophyse, cela ne semble pas le cas pour les partenaires Tpit et Pitx1 pour lesquels l'interaction protéique demeure inchangée par une surexpression de PKA (Maira *et al.*, 2003a; Espinoza et al., 2005). Le résultat de retard sur gel présenté à la figure 3.1B suggère plutôt que l'action de la voie CRH/AMPC/PKA favorise la liaison de Pitx1 sur son site TAAGCC à l'intérieur de l'élément CE-3. Cette augmentation d'affinité pour l'ADN peut sembler anodine. Cependant, les nombreuses observations tirées d'études réalisées sur le facteur Tpit démontrent qu'il a une très faible

affinité, en solitaire, pour son site de liaison sur le promoteur du gène POMC et que la présence de son partenaire Pitx1 est favorable à son fonctionnement. De plus, l'interaction protéique entre Tpit et Pitx1 a déjà été démontrée par la méthode de co-immunoprécipitation (Lamolet *et al.*, 2001; Maira *et al.*, 2003a). Ainsi, la fonction de Pitx1 sur le Tpit/Pitx1-RE pourrait consister à maintenir Tpit à l'ADN afin d'obtenir un effet transcriptionnel maximal en cas de stimulation hormonale. Un mécanisme semblable entre le facteur à boîte T Tbx5 et le facteur à homéodomaine Nkx2-5 a d'ailleurs été décrit au cours de la différenciation des cardiomyocytes où la surexpression de Nkx2-5 favorise non seulement la formation de complexe Tbx5/Nkx2-5 mais également la liaison de Tbx5 sur sa cible (Hiroi *et al.*, 2001). Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée par la méthode de retard sur gel utilisée dans le cas de Tbx5 et Nkx2-5 avec une sonde d'ADN identique au Tpit/Pitx1-RE présent dans le promoteur du gène POMC.

4.7 Tpit et ses coactivateurs dans la différenciation terminale des cellules corticotropes

Les travaux présentés dans ce mémoire démontrent qu'un recrutement de coactivateurs SRC/p160 sur le domaine N-terminal de Tpit, vraisemblablement favorisé par des modifications post-traductionnelles induites par la signalisation CRH/AMPc/PKA, est requis pour une réponse hormonale adéquate sur l'élément Tpit/Pitx1-RE. Puisque l'axe HPA est mis en fonction dans les derniers jours fœtaux seulement (e15), ce mécanisme n'est applicable jusqu'à présent que chez l'adulte. Cependant, il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme combinant modifications post-traductionnelles et interactions protéiques peut également s'appliquer à la protéine Tpit impliquée cette fois-ci dans les étapes de différenciation terminale des cellules

corticotropes. Étant donné que l'expression de *Tpit* (e12.5) précède par moins d'un demi-jour embryonnaire celle de POMC comme le révèle la souris *TPIT*^{-/-}, il doit forcément y avoir un mécanisme pour maximiser l'activité transcriptionnelle de *Tpit* afin de permettre la transcription accrue du gène POMC. Est-ce que le recrutement de coactivateurs ne serait pas un moyen efficace pour parvenir à ce but? Cette option semble à première vue plausible puisque l'expression des coactivateurs est détectée très tôt dans l'embryon, mais suggère qu'un autre signal soit impliqué (si des modifications post-traductionnelles sont pré-requises) étant donné que la cascade CRH n'est pas fonctionnelle à ce temps plus précoce. Si cette hypothèse de recrutement de coactivateur s'avère juste, elle pourrait fournir une explication valable pour la perte de fonction de la forme mutante *Tpit* M86R identifiée chez un patient présentant un déficit isolé en ACTH (IAD) et pour laquelle les études moléculaires préliminaires semblent démontrer une capacité réduite mais non radicale de liaison à l'ADN en solo ainsi qu'en combinaison avec son partenaire *Pitx1* (Metherell et al., 2004) et données non-publiées de Sophie Vallette-Kasic). De plus, la position du résidu Met86 en surface de la structure cristallographique corréle plutôt bien avec l'hypothèse que son remplacement par une arginine basique puisse affecter l'interaction protéique directement ou indirectement, possiblement en modifiant la structure du domaine N-terminal voisin. Cette mutation pourrait donc illustrer l'importance du mécanisme de recrutement de coactivateurs dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de *Tpit* au cours de la différenciation terminale des corticotropes.

4.8 Pertinence *in vivo* du rôle de Tpit dans la réponse à la CRH

L'étude réalisée dans ce mémoire est basée sur une compilation de données *in vitro* qui démontrent que Tpit joue un rôle dans la régulation hormonale du gène POMC. Cependant, il serait intéressant de faire une étude *in vivo* plus représentative de la réalité pour valider nos données *in vitro*. La manière la plus simple aurait été de vérifier directement la réponse au stress dans la souris TPIT-/- disponible dans le laboratoire. Malheureusement, la perte du gène TPIT cause une absence presque totale des cellules corticotropes et une interruption de l'axe HPA. Toutefois, puisque j'ai identifié le domaine N-terminal comme étant l'interface d'interaction essentielle à l'effet synergique de PKA et SRC-2, il serait possible d'utiliser cette version tronquée du gène pour générer des souris « knock in » exprimant la protéine Tpit $\Delta N2$ toujours active en transcription au lieu du Tpit endogène. Si la perte d'interaction Tpit-SRC n'affecte pas la fonction de Tpit au cours de la différenciation terminale des cellules corticotropes, les souris devraient présenter un phénotype normal au moment du développement de l'hypophyse et révéler un défaut de réponse au stress à des temps plus tardifs si l'interaction Tpit-SRC est réellement essentielle à cet effet de la CRH. Par ailleurs, il n'est pas impossible de retrouver aucun phénotype étant donné que plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme étant des médiateurs de cette réponse hormonale sur le promoteur du gène POMC et qu'ils pourraient agir de façon redondante. Inversement, si l'hypothèse de formation d'un méga-complexe au promoteur en réponse à la CRH est applicable *in vivo*, la perte d'un seul point d'ancrage pourrait perturber son assemblage ou déstabiliser son organisation et produire un phénotype plus ou moins sévère chez les souris « knock in ». Dans le domaine de la recherche scientifique, l'étude *in vivo* est probablement la plus valable des validations qu'il soit possible de faire, ce qui justifie l'intérêt de générer des

souris mutantes afin de poursuivre le projet. Cependant, un antisens dirigé contre l'ARNm de *Tpit* pourrait aussi être utilisé afin d'éliminer la protéine dans notre modèle de cellules corticotropes différenciées AtT-20 pour ensuite mesurer les variations des niveaux de messager et de protéine POMC avec et sans stimulation CRH. Bien que plus simple et plus rapide, il ne faut pas oublier que cette technique a des limitations dans l'efficacité de l'antisens qui n'atteint que très rarement 100% ainsi que dans le modèle de cellules qui ont été transformées et qui cyclent, contrairement à la cellule corticotrope normale. Pour ces raisons, l'alternative du « knock in » dans la souris demeure le modèle d'étude par excellence.

4.9 Conclusions

Dans ce mémoire, j'ai présenté des résultats qui démontrent que *Tpit* a maintenant une fonction chez l'adulte puisqu'il joue un rôle clé dans la réponse hormonale médiée par l'élément *Tpit/Pitx1-RE* (CE-3). J'ai décrit le mécanisme responsable de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce facteur qui fait intervenir la voie de signalisation CRH/PKA/MAPK ainsi que les coactivateurs de la famille SRC/p160. Les résultats d'isofocalisation bidimensionnelle montrent que le signal CRH mène à la modification de la protéine *Tpit*, générant une nouvelle forme de la protéine possiblement phosphorylée qui pourrait posséder une capacité accrue d'interaction avec les coactivateurs. D'autres résultats illustrent également l'importance de la phosphorylation adéquate des coactivateurs dans ce mécanisme. Malgré tout, il reste encore beaucoup de travail à faire sur le sujet pour caractériser l'organisation des différents médiateurs et cofacteurs décrits précédemment requise pour générer une réponse hormonale structurée et adéquate sur le promoteur ainsi que pour déterminer la pertinence *in vivo* de

l'implication de Tpit dans la réponse hormonale sur le promoteur du gène POMC et le possible rôle d'un tel mécanisme de recrutement de coactivateurs par Tpit dans les étapes de différenciation terminale des cellules corticotropes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Samra,A.B., Harwood,J.P., Catt,K.J., and Aguilera,G. (1987). Mechanisms of action of CRF and other regulators of ACTH release in pituitary corticotrophs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **512**, 67-84.
- Agulnik,S.I., Bollag,R.J., and Silver,L.M. (1995). Conservation of the T-box gene family from *Mus musculus* to *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, **25**, 214-219.
- Auernhammer,C.J. and Melmed,S. (2000). Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr. Rev.*, **21**, 313-345.
- Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.*, **11**, 1370-1380.
- Batsche,E., Muchardt,C., Behrens,J., Hurst,H.C., and Cremisi,C. (1998). RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3647-3658.
- Benecke,A., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (2000). Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.*, **1**, 151-157.
- Benjannet,S., Rondeau,N., Day,R., Chrétien,M., and Seidah,N.G. (1991). PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3564-3568.
- Berger,M., Adams,S., Tigges,B., Sprague,S., Wang,X.J., Collins,D., and McKenna,D. (2006). Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells. *Cytotherapy.*, **8**, 480-487.
- Bicknell,A.B. (2002). Identification of a receptor for N-POMC peptides. *Endocr. Res.*, **28**, 309-314.
- Bilezikjian,L.M. and Vale,W.W. (1987). Regulation of ACTH secretion from corticotrophs: the interaction of vasopressin and CRF. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **512**, 85-96.

Binkley, S. A. Endocrinology. 1995. Haper Collins College Publishers.
Ref Type: Generic

Bishop,J.F. and Mouradian,M.M. (1993). Characterization of a corticotropin releasing hormone responsive region in the murine proopiomelanocortin gene. *Mol. Cell Endocrinol.* **97**, 165-171.

Bishop,J.F., Rinaudo,M.S., Ritter,J.K., Chang,A.C., Conant,K., and Gehlert,D.R. (1990). A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. *FEBS Lett.* **264**, 125-129.

Bohm,M. and Luger,T.A. (2004). Melanocortins in fibroblast biology--current update and future perspective for dermatology. *Exp. Dermatol.* **13 Suppl 4**, 16-21.

Bousquet,C., Ray,D.W., and Melmed,S. (1997). A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J. Biol. Chem.* **272**, 10551-10557.

Boutillier,A.L., Gaiddon,C., Lorang,D., Roberts,J.L., and Loeffler,J.P. (1998). Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein. *Pituitary*, **1**, 33-43.

Boutillier,A.L., Monnier,D., Lorang,D., Lundblad,J.R., Roberts,J.L., and Loeffler,J.P. (1995). Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol. Endocrinol.* **9**, 745-755.

Boutillier,A.L., Sassone-Corsi,P., and Loeffler,J.P. (1991). The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cels. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1301-1310.

Castro,M.G. and Morrison,E. (1997). Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev. Neurobiol.* **11**, 35-57.

Charmandari,E., Tsigos,C., and Chrousos,G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 259-284.

Chen,D., Zhao,M., and Mundy,G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, **22**, 233-241.

Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy, L, Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M. (1997a). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.

Chen,S.L., Dowhan,D.H., Hosking,B.M., and Muscat,G.E. (2000). The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C- dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.*, **14**, 1209-1228.

Chen,S.L., Loffler,K.A., Chen,D., Stallcup,M.R., and Muscat,G.E. (2002). The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J. Biol. Chem.*, **277**, 4324-4333.

Chen,X.W., Ying,W.Z., Valentin,J.P., Ling,K.T., Lin,S.Y., Wiedemann,E., and Humphreys,M.H. (1997b). Mechanism of the natriuretic action of gamma-melanocyte-stimulating hormone. *Am. J. Physiol.* **272**, R1946-R1953.

Chhajlani,V. (1996). Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 73-80.

Clark,A.J.L., Lavender,P.M., Coates,Ph., Johnson,M.R., and Rees,L.H. (1990). In vitro and in vivo analysis of the processing and fate of the peptide products of the short proopiomelanocortin mRNA. *Mol. Endocrinol.*, **4**, 1737-1743.

Clarke,D., Fearon,U., Cunningham,S.K., and McKenna,T.J. (1996). The steroidogenic effects of beta-endorphin and joining peptide: a potential role in the modulation of adrenal androgen production. *J. Endocrinol.*, **151**, 301-307.

Cole,T.J., Blendy,J.A., Monaghan,A.P., Krieglstein,K., Schmid,W., Aguzzi,A., Fantuzzi,G., Hummler,E., Unsicker,K., and Schutz,G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.*, **9**, 1608-1621.

Coleman,K.M., Dutertre,M., El Gharbawy,A., Rowan,B.G., Weigel,N.L., and Smith,C.L. (2003). Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J. Biol. Chem.*, **278**, 12834-12845.

Cool,D.R., Fenger,M., Snell,C.R., and Loh,Y.P. (1995). Identification of the sorting signal motif within pro-opiomelanocortin for the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8723-8729.

de Keyzer,Y., Rene,P., Lenne,F., Auzan,C., Clauser,E., and Bertagna,X. (1997). V3 vasopressin receptor and corticotropic phenotype in pituitary and nonpituitary tumors. *Horm. Res.*, **47**, 259-262.

DeBold,C.R., Nicholson,W.E., and Orth,D.N. (1988). Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues. *Endocrinology*, **66**, 2648-2657.

Debold,C.R., Sheldon,W.R., DeCherney,G.S., Jackson,R.V., Alexander,A.N., Vale,W., Rivier,J., and Orth,D.N. (1984). Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor. *J. Clin. Invest.* **73**, 533-538.

Drouin,J., Chamberland,M., Charron,J., Jeannotte,L., and Nemer,M. (1985). Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Lett.*, **193**, 54-58.

Drouin,J., Charron,J., Gagner,J.-P., Jeannotte,L., Nemer,M., Plante,R.K., and Wrange,O. (1987). Pro-opiomelanocortin gene: a model for negative regulation of transcription by glucocorticoids. *J. Cell. Biochem.*, **35**, 283-304.

Drouin,J., Nemer,M., Charron,J., Gagner,J.-P., Jeannotte,L., Sun,Y.L., Therrien,M., and Tremblay,Y. (1989a). Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome*, **31**, 510-519.

Drouin,J., Sun,Y.L., Chamberland,M., Gauthier,Y., De Léan,A., Nemer,M., and Schmidt,T.J. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.*, **12**, 145-156.

Drouin,J., Trifiro,M.A., Plante,R.K., Nemer,M., Eriksson,P., and Wrange,Ö. (1989b). Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5305-5314.

Dugan,L.L., Kim,J.S., Zhang,Y., Bart,R.D., Sun,Y., Holtzman,D.M., and Gutmann,D.H. (1999). Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25842-25848.

Espinoza,H.M., Ganga,M., Vadlamudi,U., Martin,D.M., Brooks,B.P., Semina,E.V., Murray,J.C., and Amendt,B.A. (2005). Protein kinase C phosphorylation modulates N- and C-terminal regulatory activities of the PITX2 homeodomain protein. *Biochemistry*, **44**, 3942-3954.

Flerko,B. (1980). Fourth Geoffrey Harris Memorial Lecture: The hypophysial portal circulation today. *Neuroendocrinology*. **30**, 56-63.

Foot,N.J., Orgeig,S., and Daniels,C.B. (2006). The evolution of a physiological system: The pulmonary surfactant system in diving mammals. *Respir. Physiol Neurobiol.*

Frigo,D.E., Basu,A., Nierth-Simpson,E.N., Weldon,C.B., Dugan,C.M., Elliott,S., Collins-Burow,B.M., Salvo,V.A., Zhu,Y., Melnik,L.I., Lopez,G.N., Kushner,P.J., Curiel,T.J., Rowan,B.G., McLachlan,J.A., and Burow,M.E. (2006). p38 MAPK Stimulates Estrogen-Mediated Transcription and Proliferation Through the Phosphorylation and Potentiation of the p160 Coactivator GRIP1. *Mol. Endocrinol.*

Fu,X.M., Yu,J.L., Liu,G.X., and Deng,B. (2004). [Comparison of the effect of ambroxol and dexamethasone on the expression of pulmonary surfactant proteins in the fetal rat lungs]. *Zhonghua Er. Ke. Za Zhi.*, **42**, 450-453.

Gerhardstein,B.L., Puri,T.S., Chien,A.J., and Hosey,M.M. (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*. **38**, 10361-10370.

Gibert,Y. and Begemann,G. (2002). Variations on a 'T': orchestration of T-box signalling in development. *Trends Genet.*, **18**, 615-616.

Gillies,G.E., Linton,E.A., and Lowry,P.J. (1982). Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*. **299**, 355-357.

Gregory,C.W., Fei,X., Ponguta,L.A., He,B., Bill,H.M., French,F.S., and Wilson,E.M. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J. Biol. Chem.*, **279**, 7119-7130.

Gruber,K.A. and Callahan,M.F. (1989). ACTH-(4-10) through gamma-MSH: evidence for a new class of central autonomic nervous system-regulating peptides. [Review]. *Am. J. Physiol.*, **257**, Pt 2):R681-94.

Hadley, M. E. Endocrinology, 5th edition. 2000. New Jersey, USA, Prentice Hall, NJ.
Ref Type: Generic

Hadley,M.E. and Haskell-Luevano,C. (1999). The proopiomelanocortin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **885**, 1-21.

- Hammer,G.D., Krylova,I., Zhang,Y., Darimont,B.D., Simpson,K., Weigel,N.L., and Ingraham,H.A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol. Cell*, **3**, 521-526.
- Harrold,J.A., Widdowson,P.S., and Williams,G. (2003). beta-MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? *Peptides*, **24**, 397-405.
- Hiroi,Y., Kudoh,S., Monzen,K., Ikeda,Y., Yazaki,Y., Nagai,R., and Komuro,I. (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat. Genet.*, **28**, 276-280.
- Holden,J.E., Jeong,Y., and Forrest,J.M. (2005). The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN. Clin. Issues*, **16**, 291-301.
- Hsueh,Y.P., Wang,T.F., Yang,F.C., and Sheng,M. (2000). Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*, **404**, 298-302.
- Hwang,E.S., Hong,J.H., and Glimcher,L.H. (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J. Exp. Med.*, **202**, 1289-1300.
- Jeannotte,L., Trifiro,M.A., Plante,R.K., Chamberland,M., and Drouin,J. (1987). Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4058-4064.
- Jin,W.D., Boutillier,A.L., Glucksman,M.J., Salton,S.R., Loeffler, JP, and Roberts,J.L. (1994). Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 1377-1388.
- Khosrowshahian,F., Wolanski,M., Chang,W.Y., Fujiki,K., Jacobs,L., and Crawford,M.J. (2005). Lens and retina formation require expression of Pitx3 in *Xenopus* pre-lens ectoderm. *Dev. Dyn.*, **234**, 577-589.
- Kovalovsky,D., Refojo,D., Liberman,A.C., Hochbaum,D., Pereda,M.P., Coso,O.A., Stalla,G.K., Holsboer,F., and Arzt,E. (2002). Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 1638-1651.

- Kraus,J. and Holtt,V. (1995). Identification of a cAMP-response element on the human proopiomelanocortin gene upstream promoter. *DNA Cell Biol.* **14**, 103-110.
- Lamolet,B., Poulin,G., Chu,K., Guillemot,F., Tsai,M.J., and Drouin,J. (2004). Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol. Endocrinol.* **18**, 995-1003.
- Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, **104**, 849-859.
- Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctôt,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of proopiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**, 1284-1295.
- Lanctôt,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999a). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology*, **140**, 1416-1422.
- Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999b). Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development*, **126**, 1805-1810.
- Lee,A.K. and Tse,A. (1997). Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic Ca²⁺ rise in identified rat corticotrophs. *J. Physiol.* **504** (Pt 2), 367-378.
- Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, **268**, 836-844.
- Lee,S.K., Kim,H.J., Na,S.Y., Kim,T.S., Choi,H.S., Im,S.Y., and Lee,J.W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J. Biol. Chem.* **273**, 16651-16654.
- Leo,C. and Chen,J.D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*, **245**, 1.
- Liu,B., Hammer,G.D., Rubinstein,M., Mortrud,M., and Low,M.J. (1992). Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3978-3990.

- Liu,B., Mortrud,M., and Low,M.J. (1995). DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem. J.*, **312** (Pt 3), 827-832.
- Loh,Y.P., Maldonado,A., Zhang,C., Tam,W.H., and Cawley,N. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **971**, 416-425.
- Luini,A., Lewis,D., Guild,S., Corda,D., and Axelrod,J. (1985). Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8034-8038.
- Maira,M.H., Couture,C., Le Martelot,G., Pulichino,A.M., Bilodeau,S., and Drouin,J. (2003a). The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46523-46532.
- Maira,M.H., Martens,C., Batsche,E., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2003b). Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 763-776.
- Maira,M.H., Martens,C., Philips,A., and Drouin,J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7549-7557.
- Marcil,A., Dumontier,É., Chamberland,M., Camper,S.A., and Drouin,J. (2003). *Pitx1* and *Pitx2* are required for development of hindlimb buds. *Development*, **130**, 45-55.
- Martens,C., Bilodeau,S., Maira,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2005). Protein:protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.*, **19**, 885-897.
- Massague,J., Seoane,J., and Wotton,D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.*, **19**, 2783-2810.
- Melamed,P., Koh,M., Preklathan,P., Bei,L., and Hew,C. (2002). Multiple mechanisms for Pitx-1 transactivation of a luteinizing hormone beta subunit gene. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26200-26207.

Metherell,L.A., Savage,M.O., Dattani,M., Walker,J., Clayton,P.E., Farooqi,I.S., and Clark,A.J. (2004). TPIT mutations are associated with early-onset, but not late-onset isolated ACTH deficiency. *Eur. J. Endocrinol.*, **151**, 463-465.

Mishina,M., Kurosaki,T., Yamamoto,Y., Notake,M., Masu,M., and Numa,S. (1982). DNA sequences required for transcription in vivo of the human corticotropin-b-lipotropin precursor gene. *EMBO J.*, **1**, 1533-1538.

Muglia,L., Jacobson,L., Dikkes,P., and Majzoub,J.A. (1995). Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*, **373**, 427-432.

Muglia,L.J., Jacobson,L., Weninger,S.C., Karalis,K.P., Jeong,K., and Majzoub,J.A. (2001). The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. *Peptides*, **22**, 725-731.

Muller,E.E., Locatelli,V., and Cocchi,D. (1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev.*, **79**, 511-607.

Muller,M.B., Preil,J., Renner,U., Zimmermann,S., Kresse,A.E., Stalla,G.K., Keck,M.E., Holsboer,F., and Wurst,W. (2001). Expression of CRHR1 and CRHR2 in mouse pituitary and adrenal gland: implications for HPA system regulation. *Endocrinology*, **142**, 4150-4153.

Murre,C., McCaw,P.S., Vaessin,H., Caudy,M., Jan,L.Y., Jan,Y.N., Cabrera,C.V., Buskin,J.N., Hauschka,S.D., Lassar,A.B., Weintraub,H., and Baltimore,D. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.

Mynard,V., Guignat,L., Devin-Leclerc,J., Bertagna,X., and Catelli,M.G. (2002). Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology*, **143**, 3916-3924.

Mynard,V., Latchoumanin,O., Guignat,L., Devin-Leclerc,J., Bertagna,X., Barre,B., Fagart,J., Coqueret,O., and Catelli,M.G. (2004). Synergistic signaling by corticotropin-releasing hormone and leukemia inhibitory factor bridged by phosphorylated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein at the Nur response element (NurRE)-signal transducers and activators of transcription (STAT) element of the proopiomelanocortin promoter. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 2997-3010.

Na,S.Y., Lee,S.K., Han,S.J., Choi,H.S., Im,S.Y., and Lee,J.W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10831-10834.

Naiche,L.A., Harrelson,Z., Kelly,R.G., and Papaioannou,V.E. (2005). T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 219-239.

Nakai,Y., Usui,T., Tsukada,T., Takahashi,H., Fukata,J., Fukushima,M., Senoo,K., and Imura,H. (1991). Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 301-306.

Nakanishi,S., Inoue,A., Kita,T., Nakamura,M., Chang,A.C.Y., Cohen,S.N., and Numa,S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*, **278**, 423-427.

Naya,F.J., Stellrecht,C.M.M., and Tsai,M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.*, **9**, 1009-1019.

Newell-Price,J. (2003). Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J. Endocrinol.*, **177**, 365-372.

Newell-Price,J., King,P., and Clark,A.J. (2001). The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 338-348.

Nudi,M., Ouimette,J.F., and Drouin,J. (2005). Bone morphogenic protein (Smad)-mediated repression of proopiomelanocortin transcription by interference with Pitx/Tpit activity. *Mol. Endocrinol.*, **19**, 1329-1342.

Oates,E. and Herbert,E. (1983). 5' Sequence of porcine and rat pro-opiomelanocortin mRNA. *J. Biol. Chem.*, **259**, 7421-7425.

Ooi,G.T., Tawadros,N., and Escalona,R.M. (2004). Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol. Cell Endocrinol.*, **228**, 1-21.

Packham,E.A. and Brook,J.D. (2003). T-box genes in human disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, R37-R44.

Page,R.B. (1982). Pituitary blood flow. *Am. J. Physiol.*, **243**, E427-E442.

- Papaioannou,V.E. and Silver,L.M. (1998). The T-box gene family. *Bioessays*, **20**, 9-19.
- Pawson,A.J. and McNeilly,A.S. (2005). The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod. Sci.*, **88**, 75-94.
- Persani,L. (1998). Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity. *Thyroid*, **8**, 941-946.
- Pflugfelder,G.O., Roth,H., and Poeck,B. (1992). A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 918-925.
- Philips,A., Lesage,S., Gingras,R., Maira,M.H., Gauthier,Y., Hugo,P., and Drouin,J. (1997a). Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5946-5951.
- Philips,A., Maira,M.H., Mullick,A., Chamberland,M., Lesage,S., Hugo,P., and Drouin,J. (1997b). Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5952-5959.
- Picon,A., Bertagna,X., and de Keyzer,Y. (1999). Analysis of the human proopiomelanocortin gene promoter in a small cell lung carcinoma cell line reveals an unusual role for E2F transcription factors. *Oncogene*, **18**, 2627-2633.
- Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000). Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4826-4837.
- Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6673-6682.
- Preil,J., Muller,M.B., Gesing,A., Reul,J.M., Sillaber,I., van Gaalen,M.M., Landgrebe,J., Holsboer,F., Stenzel-Poore,M., and Wurst,W. (2001). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. *Endocrinology*, **142**, 4946-4955.
- Pulichino,A.M., Lamolet,B., Brue,T., Enjalbert,A., David,M., Malpuech,G., and Drouin,J. (2001). Tpit, un nouveau membre de la famille des gènes à boîte T, est impliqué dans la déficience isolée en ACTH. *MS-Medecine Sciences*, **17**, 1203-1207.

Pulichino,A.M., Vallette-Kasic,S., Couture,C., Gauthier,Y., Brue,T., David,M., Malpuech,G., Deal,C., Van Vliet,G., De Vroede,M., Riepe,F.G., Partsch,C.J., Sippell,W.G., Berberoglu,M., Atasay,B., and Drouin,J. (2003a). Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev.* **17**, 711-716.

Pulichino,A.M., Vallette-Kasic,S., Tsai,J.P.Y., Couture,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2003b). Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev.* **17**, 738-747.

Qiu,W., Zhuang,S., von Lintig,F.C., Boss,G.R., and Pilz,R.B. (2000). Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31921-31929.

Quirk,C.C., Lozada,K.L., Keri,R.A., and Nilson,J.H. (2001). A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHBeta promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 734-746.

Raffin-Sanson,M.L., de Keyser,Y., and Bertagna,X. (2003a). Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur. J. Endocrinol.*, **149**, 79-90.

Ray,D.W., Ren,S.G., and Melmed,S. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J. Clin. Invest.*, **97**, 1852-1859.

Rayala,S.K., Talukder,A.H., Balasenthil,S., Tharakan,R., Barnes,C.J., Wang,R.A., Aldaz,M., Khan,S., and Kumar,R. (2006). P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor- α activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res.*, **66**, 1694-1701.

Reichardt,H.M., Kaestner,K.H., Tuckermann,J., Kretz,O., Wessely,O., Bock,R., Gass,P., Schmid,W., Herrlich,P., Angel,P., and Schutz,G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, **93**, 531-541.

Reisine,T., Rougon,G., Barbet,J., and Affolter,H.U. (1985). Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin-hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8261-8265.

Riegel,A.T., Lu,Y., Remenick,J., Wolford,R.G., Berard,D.S., and Hager,G.L. (1991). Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1973-1982.

Riegel,A.T., Remenick,J., Wolford,R.G., Berard,D.S., and Hager,G.L. (1990). A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the proopiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4513-4521.

Rindler,M.J. (1998). Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *J. Biol. Chem.* **273**, 31180-31185.

Rivier,C., Rivier,J., Mormede,P., and Vale,W. (1984). Studies of the nature of the interaction between vasopressin and corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology* **115**, 882-886.

Rouzaud,F., Kadekaro,A.L., Abdel-Malek,Z.A., and Hearing,V.J. (2005). MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat. Res.* **571**, 133-152.

Rowan,B.G., Garrison,N., Weigel,N.L., and O'Malley,B.W. (2000a). 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8720-8730.

Rowan,B.G., Weigel,N.L., and O'Malley,B.W. (2000b). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 4475-4483.

Saland,L.C. (2001). The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. *Brain Res. Bull.* **54**, 587-593.

Samson,W.K., Taylor,M.M., and Baker,J.R. (2003). Prolactin-releasing peptides. *Regul. Pept.* **114**, 1-5.

Slominski,A., Wortsman,J., Luger,T., Paus,R., and Solomon,S. (2000). Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev.* **80**, 979-1020.

Smart,J.L. and Low,M.J. (2003). Lack of proopiomelanocortin peptides results in obesity and defective adrenal function but normal melanocyte pigmentation in the murine C57BL/6 genetic background. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **994**, 202-210.

Smith,A.I. and Funder,J.W. (1988). Pro-opiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.*, **9**, 159-179.

Smith,J. (1999). T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.*, **15**, 154-158.

Solomon,S. (1999). POMC-derived peptides and their biological action. *Ann. NY Acad. Sci.*, **885**, 22-40.

Spencer,T.E., Jenster,G., Burcin,M.M., Allis,C.D., Zhou,J., Mizzen,C.A., McKenna,N.J., Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.

Suh,H., Gage,P.J., Drouin,J., and Camper,S.A. (2002). *Pitx2* is required at multiple stages of pituitary organogenesis : pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, **129**, 329-337.

Szeto,D.P., Rodriguez-Esteban,C., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., Liu,F., Kioussi,C., Gleiberman,A.S., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor *Pitx1* in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.*, **13**, 484-494.

Szeto,D.P., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., and Rosenfeld,M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7706-7710.

Takahashi,H., Teranishi,Y., Nakanishi,S., and Numa,S. (1981). Isolation and structural organization of the human ACTH - b-LPH precursor gene. *FEBS Lett.*, **135**, 97-102.

Theodosios,D.T. and Poulain,D.A. (1999). Contribution of astrocytes to activity-dependent structural plasticity in the adult brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **468**, 175-182.

Therrien,M. and Drouin,J. (1991). Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3492-3503.

- Therrien,M. and Drouin,J. (1993). Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2342-2353.
- Tonosaki,Y., Cruijsen,P.M., Nishiyama,K., Yaginuma,H., and Roubos,E.W. (2004). Low temperature stimulates alpha-melanophore-stimulating hormone secretion and inhibits background adaptation in *Xenopus laevis*. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 894-905.
- Torchia,J., Rose,D.W., Inostroza,J., Kamei,Y., Westin,S., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-684.
- Tremblay,A., Tremblay,G.B., Labrie,F., and Giguere,V. (1999a). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell*, **3**, 513-519.
- Tremblay,J.J. and Drouin,J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2567-2576.
- Tremblay,J.J., Goodyer,C.G., and Drouin,J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol.* **71**, 277-286.
- Tremblay,J.J., Lanctôt,C., and Drouin,J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* **12**, 428-441.
- Tremblay,J.J., Marcil,A., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999b). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* **18**, 3431-3441.
- Tremblay,Y., Tretjakoff,I., Peterson,A., Antakly,T., Zhang,C.X., and Drouin,J. (1988). Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8890-8894.
- Tsatmali,M., Ancans,J., and Thody,A.J. (2002). Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 125-133.

- Uhler,M. and Herbert,E. (1983). Complete amino acid sequence of mouse pro-opiomelanocortin derived from the nucleotide sequence of pro-opiomelanocortin cDNA. *J. Biol. Chem.*, **258**, 257-261.
- Vallette-Kasic,S., Pulichino,A.M., Gueydan,M., Barlier,A., David,M., Malpuech,G., Deal,C., Van Vliet,G., de Vroede,M., Riepe,F., Partsch,C.J., Sippell,W., Berberoglu,M., Atasay,B., de Zegher,F., Kyllö,J., Donohoue,P., Dechelotte,P., Fassnacht,M., Noordam,K., Dunkel,L., Pigeon,B., Weill,J., Yigit,S., Brauner,R., Leger,J., Heinrich,J.J., Enjalbert,A., Brue,T., and Drouin,J. (2004). A neonatal form of isolated ACTH deficiency frequently associated with Tpit gene mutations. *Endocr. Res.*, **30**, 943-944.
- van den Munckhof,P., Luk,K.C., Sainte-Marie,L., Montgomery,J., Blanchet,P.J., Sadikot,A.F., and Drouin,J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development*, **130**, 2535-2542.
- Venihaki,M. and Majzoub,J. (2002). Lessons from CRH knockout mice. *Neuropeptides*, **36**, 96-102.
- Venihaki,M. and Majzoub,J.A. (1999). Animal models of CRH deficiency. *Front Neuroendocrinol.*, **20**, 122-145.
- von Dreden,G., Loeffler,J.P., Grimm,C., and Holtt,V. (1988). Influence of calcium ions on proopi melanocortin mRNA levels in clonal anterior pituitary cells. *Neuroendocrinol.*, **47**, 32-37.
- Voogt,J.L., Lee,Y., Yang,S., and Arbogast,L. (2001). Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. *Prog. Brain Res.*, **133**, 173-185.
- Voronova,A. and Baltimore,D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4722-4726.
- Vossler,M.R., Yao,H., York,R.D., Pan,M.G., Rim,C.S., and Stork,P.J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, **89**, 73-82.
- Wang,Z., Dillon,T.J., Pokala,V., Mishra,S., Labudda,K., Hunter,B., and Stork,P.J. (2006). Rap1-Mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases by Cyclic AMP Is Dependent on the Mode of Rap1 Activation. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 2130-2145.

Wetzel,W., Balschun,D., Janke,S., Vogel,D., and Wagner,T. (1994). Effects of CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) and CLIP fragments on paradoxical sleep in rats. *Peptides*, **15**, 237-241.

Xu,J. and Li,Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.*, **17**, 1681-1692.

Xu,J. and O'Malley,B.W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev. Endocr. Metab Disord.*, **3**, 185-192.

Yanagisawa,J., Yanagi,Y., Masuhiro,Y., Suzawa,M., Watanabe,M., Kashiwagi,K., Toriyabe,T., Kawabata,M., Miyazono,K., and Kato,S. (1999). Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, **283**, 1317-1321.

Yaswen,L., Diehl,N., Brennan,M.B., and Hochgeschwender,U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.*, **5**, 1066-1070.

Ye,L., Li,X., Kong,X., Wang,W., Bi,Y., Hu,L., Cui,B., Li,X., and Ning,G. (2005). Hypomethylation in the promoter region of POMC gene correlates with ectopic overexpression in thymic carcinoids. *J. Endocrinol.*, **185**, 337-343.

Yi,P., Wu,R.C., Sandquist,J., Wong,J., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., Means,A.R., and O'Malley,B.W. (2005). Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9687-9699.

Yoshioka,H., Meno,C., Koshiba,K., Sugihara,M., Itoh,H., Ishimaru,Y., Inoue,T., Ohuchi,H., Semina,E.V., Murray,J.C., Hamada,H., and Noji,S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*, **94**, 299-305.

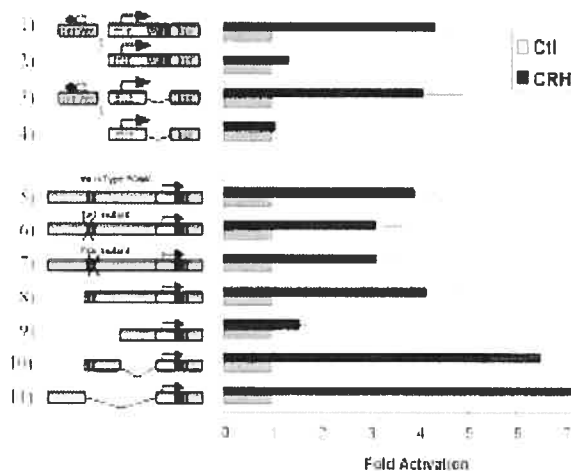
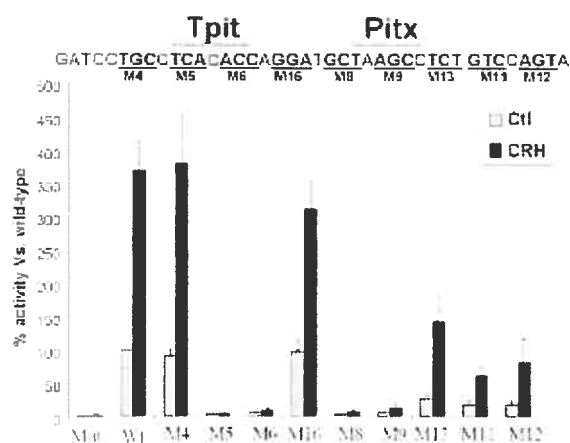
Young,J.I., Otero,V., Cerdan,M.G., Falzone,T.L., Chan,E.C., Low,M.J., and Rubinstein,M. (1998). Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J. Neurosci.*, **18**, 6631-6640.

Zhang,L., Li,W.H., Anthonavage,M., and Eisinger,M. (2005). Melanocortin-5 receptor: A marker of human sebocyte differentiation. *Peptides*.

Zhao,H., Nakajima,R., Kunimoto,H., Sasaki,T., Kojima,H., and Nakajima,K. (2004). Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 541-548.

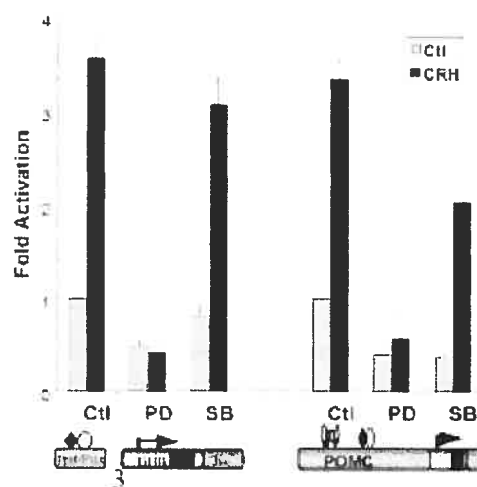
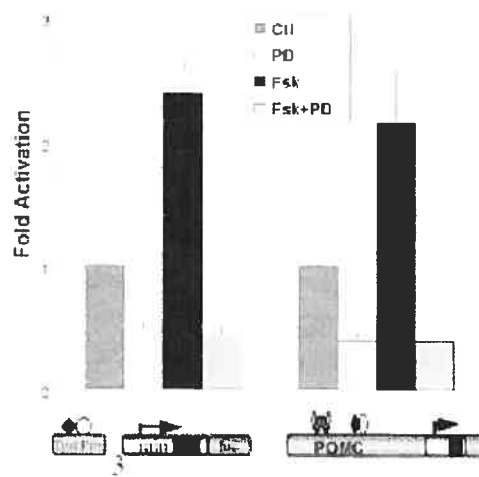
Zhou,A., Bloomquist,B.T., and Mains,R.E. (1993). The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1763-1769.

ANNEXES

A**B**

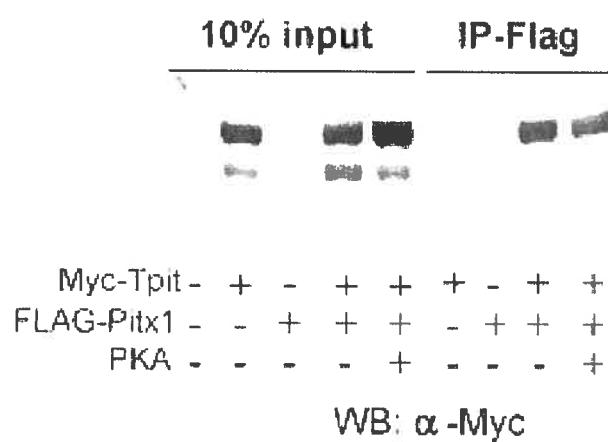
Résultats tirés de la publication Maira et al., 2003a

Annexe 1 L'élément CE-3 (Tpit/Pitx1-RE) du promoteur POMC est un médiateur de la réponse à l'hormone hypothalamique CRH. La mutation des sites de liaison pour Tpit (A6) et Pitx1 (A7) dans le contexte du promoteur entier n'affecte pas la réponse hormonale en transfection transitoire. L'élément CE-3 isolé (A1) est cependant capable de reproduire la réponse à la CRH de la même façon que le promoteur entier. (A5) Les deux sites de liaison sont nécessaires autant pour l'activation transcriptionnelle basale que pour l'activation hormonale par la CRH de l'élément CE-3. (B)

A**B**

Résultats tirés de la publication Maira *et al.*, 2003a

Annexe 2 Les voies AMPc/PKA et MAPK sont toutes deux nécessaires à l'activation de l'élément CE-3 par la CRH. L'activation de l'élément CE-3 par la CRH en transfection transitoire est complètement bloquée par un traitement avec l'inhibiteur de MEK1 (PD), ce qui démontre l'implication de la voie MAPK. (A) L'activation induite par le traitement avec l'activateur de l'adénylate cyclase (Fsk) démontre que PKA agit sur le Tpit/Pitx1-RE et le blocage complet de cette activation obtenu avec le traitement PD confirme que la voie MAPK est en aval de PKA. (B)



Résultats tirés de la publication Maira *et al.*, 2003a

Annexe 3 La capacité d'interaction entre Tpit et Pitx1 n'est pas augmentée par la surexpression de la sous-unité catalytique de PKA. La quantité de protéine Tpit co-immunoprécipitée avec Pitx1 ne varie pas avec ou sans surexpression de PKA.

